

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JULIANA GOUVEIA GALVÃO**

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O ENCAPSULAMENTO  
DE CARVACROL: UMA  
FORMULAÇÃO PROMISSORA PARA O  
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES**

**SÃO CRISTÓVÃO-SE  
2019**

JULIANA GOUVEIA GALVÃO

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O ENCAPSULAMENTO  
DE CARVACROL: UMA  
FORMULAÇÃO PROMISSORA PARA O  
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de  
Sergipe como requisito para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Rogéria de Souza Nunes.

**Co-Orientadores:** Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella e  
Prof. Dr. Ricardo Scher.

**SÃO CRISTÓVÃO-SE  
2019**

JULIANA GOUVEIA GALVÃO

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA O ENCAPSULAMENTO  
DE CARVACROL: UMA  
FORMULAÇÃO PROMISSORA PARA O  
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES**

Tese apresentada a Universidade Federal de Sergipe,  
como requisito para obtenção do título de Doutor em  
Ciências Farmacêuticas.

São Cristóvão-SE, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Rogéria de Souza Nunes**

Departamento de Farmácia – Universidade Federal de Sergipe

---

**Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo**

Departamento de Farmácia – Universidade Federal de Sergipe

---

**Prof. Dr. José Guedes de Sena Filho**

Embrapa

---

**Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres**

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

**Prof. Dr. Wagner Welber Arrais da Silva**

Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Sergipe

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando o meu caminho.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Orlando, e meu irmão Matheus pelo amor incondicional de vocês, por possibilitarem a oportunidade de realizar meus sonhos e acreditarem na minha capacidade e escolhas.

Ao meu noivo Tarcísio, por sempre estar presente, me dando força para continuar, acreditando no meu potencial e por diversas vezes entender minha ausência.

À minha querida orientadora, Dra. Rogéria de Souza Nunes, que desde a graduação me concedeu a oportunidade de iniciar minha caminhada científica. Muito obrigada pela confiança, dedicação, amizade, compreensão, constância, valiosas sugestões e conselhos, bem como pela oportunidade de crescimento e amadurecimento pessoal e profissional durante esses 9 anos de convivência e trabalho. Com certeza você foi a pessoa mais importante para esta conquista.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Ricardo Scher e Prof. Dr. Silvio Dolabela pela orientação, confiança, dedicação, ensinamentos, respeito, compreensão e principalmente por contribuir na minha formação durante esses 4 anos de doutorado.

Ao colaborador Prof. Dr. Hartmut Derendorf por me aceitar em seu laboratório na University of Florida durante o período de doutorado sanduíche, pela sua confiança em meu trabalho de doutorado e suas valiosas contribuições nos experimentos de farmacocinética. Também agradeço a todos do seu laboratório que de uma forma ou de outra me auxiliaram, Dr. Satya, Dr. Hardik, Dra. Vipada, Dr. Abhigyan, Dra. Wendy, Dr. Mohammad e Maria.

Ao colaborador Prof. Dr. Peter Kima pela confiança e valiosa contribuição nos experimentos envolvendo cultura de células e das leishmanias.

À Raquelzinha pela enorme ajuda nos trabalhos experimentais, pelas suas sugestões valiosas, assim como pela amizade, carinho e companheirismo nas horas em que eu mais precisei.

A todos que convivi no laboratório de farmacotécnica da UFS, em especial a Gaby, Joyce, Drika, Lícia, Rosangela, Vivi, Jeferson, Glauciene, Amanda, Alyne, Audrey, Daniela, Maiana, Layane e Dani. A vocês quero agradecer pela colaboração, carinho, amizade, torcida e, é claro, pela companhia no laboratório durante todos esses anos.

Aos meus avôs e avós, tios, primos e familiares que sempre rezaram a Deus para que me iluminasse nessa caminhada, sempre na torcida pelo meu sucesso.

Às grandes amizades que me acompanham em tudo, Gaby, Adriano, Marcelo e Felipe sempre me apoiando e aconselhando, apesar da distância. Agradeço também a todos os amigos que convivi durante o período do doutorado sanduíche, aos colegas fulbrighters e aos colegas da University at Albany.

A Capes, pelo apoio financeiro, e à Comissão Fulbright do Brasil, também pelo apoio financeiro durante a realização do doutorado sanduíche nos EUA.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFS e à Universidade Federal de Sergipe por todo o apoio.

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento atual da leishmaniose tem custo elevado, causa efeitos adversos e é ineficaz para cepas de *leishmania* resistentes. Sendo assim, moléculas derivadas de produtos naturais como o monoterpeno carvacrol, têm atraído interesse como promissores agentes anti-leishmania. Entretanto, o carvacrol tem seu uso terapêutico limitado pela sua baixa solubilidade aquosa, facilidade de oxidação e volatilização. Dessa forma, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) foi proposto no presente estudo como uma estratégia nanotecnológica promissora para contornar essas limitações e possibilitar seu uso na terapia de leishmanioses. Para isso, primeiramente foi avaliada a influência do carvacrol na matriz lipídica a partir da caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e Microscopia de luz polarizada (MLP). Os CLNs inertes e contendo carvacrol foram preparados através do método de microemulsão a quente e avaliados quanto à influência da matriz lipídica e concentração dos componentes na sua formação. Os CLNs ainda foram caracterizados por DSC e DRX. Também foi avaliada a cinética de liberação do carvacrol a partir dos CLNs, a citotoxicidade, a viabilidade sobre formas promastigotas, e o perfil farmacocinético do carvacrol livre e encapsulado. Através da avaliação da influência do carvacrol na matriz lipídica foi possível sugerir que o carvacrol também pode atuar como lipídeo líquido dos CLNs, pois foi observado nas análises de TG, DSC, SAXS e MLP que as matrizes lipídicas se tornaram menos estruturadas ao adicionar concentrações crescentes de carvacrol. Através da análise de DSC também demonstrou que o carvacrol foi miscível nos lipídeos sólidos e na faixa de concentração testados. Os CLNs inertes e contendo carvacrol foram obtidos com sucesso através do método de diluição de microemulsão a quente sendo que os CLNs contendo carvacrol que apresentaram menor diâmetro médio ( $98,42 \pm 0,80$  nm) e estreita distribuição de tamanho (adequadas para administração intravenosa) e maior eficiência de encapsulação, foram aqueles preparados com cera de abelha (EHL=9) e concentração de 5% de lipídeos e tensoativo. A diminuição nos valores de entalpia e deslocamento do pico de fusão para menores temperaturas no DSC e uma diminuição de intensidade dos picos principais de difração no DRX dos CLNs em comparação com o lipídeo sólido e tensoativo, indicam a formação de uma desordem na estrutura lipídica, característica da formação dos CLNs. O perfil de liberação do carvacrol a partir dos CLNs foi ajustado ao modelo de Korsmeyer e Peppas, e Weibull e demonstrou que o mecanismo de liberação é possivelmente do tipo difusão Fickiana. Além disso, o encapsulamento do carvacrol em CLNs proporcionou uma menor citotoxicidade em relação ao carvacrol livre ( $p < 0,05$ ). Entretanto a encapsulação do carvacrol em CLNs não modificou a viabilidade sobre formas promastigotas do parasita. Por fim, o perfil farmacocinético *in vivo* do carvacrol após administração IV em bolus sugere que este monoterpeno fenólico passa por circulação enterohepática e por isso apresentou um longo tempo de meia-vida de eliminação ( $t^{1/2}$ ) de  $51,07 \pm 2,80$  h e baixo valor de clearance (Cl) de  $0,057 \pm 0,003$  L/h. Também foi possível observar que a  $C_0$ , o  $t^{1/2}$ , tempo de residência médio (MRT) e volume de distribuição do carvacrol encapsulado foram maiores do que o carvacrol livre ( $p < 0,05$ ), o que favorece uma maior distribuição do carvacrol nos tecidos alvo. Sendo assim é possível concluir que os CLNs desenvolvidos são um promissor sistema de liberação do carvacrol para o tratamento de leishmanioses.

**Palavras-chave:** lipídeos sólidos, monoterpeno fenólico, produtos naturais, *leishmania*, nanomedicina, tratamento intravenoso.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The current leishmaniasis treatment is expensive, usually causes adverse effects and it is ineffective for resistant leishmania strains. Therefore, molecules derived from natural products as the monoterpene carvacrol, has been attracted interest as promising anti-leishmania agents. However, the therapeutical use of carvacrol is limited due to its low aqueous solubility, ease oxidation and volatilization. Thus, the development of nanostructured lipid carriers was proposed in the present study as a promising nanotechnology strategy to overcome these limitations and enable the use of carvacrol in leishmaniasis therapy. Firstly, it was evaluated the influence of carvacrol in the lipid matrix by Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG), Small Angle X-ray Scattering (SAXS) and Polarized Light Microscopy (PLM). Inert and containing carvacrol NLCs were obtained by warm microemulsion method, and evaluated regarding the influence of lipid matrix and components concentration on the NLCs formation. NLCs were characterized by DSC and XRD as well. In addition, the *in vitro* carvacrol release from NLCs, the *in vitro* cytotoxicity assay, the *in vitro* promastigotes assay, the *in vivo* pharmacokinetics evaluation of free carvacrol and encapsulated were performed. Through the evaluation of influence of carvacrol on lipid matrix, it was possible to suggest that carvacrol may act also as a liquid lipid of NLCs formulation since TG, DSC, SAXS and PLM analysis that the lipid matrix became less ordered after adding carvacrol. Furthermore, DSC analysis showed that carvacrol was miscible in the tested concentration range. NLCs containing carvacrol were obtained successfully by warm microemulsion dilution method, being the NLCs formulation that presented the lowest particle size ( $98.42 \pm 0.80$  nm) and narrow size distribution (suitable for intravenous administration), the higher encapsulation efficiency, were those prepared using beeswax as solid lipid (HLB=9) and 5% of lipids and surfactant. The *in vitro* release of carvacrol from NLCs was fitted to Korsmeyer and Peppas, and Weibull model, demonstrating that the release mechanism is probably the Fickian diffusion type. Moreover, carvacrol encapsulation in NLCs provided a lower cytotoxicity in comparison to free carvacrol ( $p < 0.05$ ). However, carvacrol encapsulation in NLCs did not change its *in vitro* promastigotes efficacy. Finally, the *in vivo* pharmacokinetics of carvacrol after IV bolus administration suggests that this phenolic monoterpene undergo enterohepatic circulation and therefore presented a long half-life ( $t^{1/2}$ ) of  $51.07 \pm 2.80$  h and low value of clearance (Cl) of  $0.057 \pm 0.003$  L/h. In addition,  $C_0$ ,  $t^{1/2}$ , mean residence time (MRT) and  $V_{dss}$  of encapsulated carvacrol were higher than free carvacrol ( $p < 0.05$ ), favoring a higher distribution of carvacrol in the target tissues. Thus, it is possible to conclude that the developed NLCs are a promising delivery system for leishmaniasis treatment.

**Keywords:** solid lipids, phenolic monoterpene, natural products, *leishmania*, nanomedicine, intravenous treatment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i> .	21
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do carvacrol.	24
<b>Figura 3:</b> Nanopartículas lipídicas: Nanopartícula lipídica sólida (NLS) e Carreadores lipídicos nanostruturados (CLNs).	31
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do método de obtenção dos CLNs por microemulsão a quente.	40
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do método indireto de determinação do carvacrol nos CLNs.	44
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do experimento de cinética de liberação in vitro do carvacrol a partir dos CLNs.	45
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do procedimento experimental da citotoxicidade in vitro em células THP-1 diferenciadas após tratamento com carvacrol-livre, CLNs com carvacrol e miltefosina.	47
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do método de extração do carvacrol a partir do plasma de rato (método de precipitação de proteínas seguido de secagem).	49
<b>Figura 9:</b> Procedimento experimental utilizado na avaliação farmacocinética in vivo do carvacrol-livre (em solução) e encapsulado, CLNs c/ carvacrol.	51
<b>Figura 10:</b> Curva de TG do ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 25% (AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente.	53
<b>Figura 11:</b> Curva DSC ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 25% (AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente.	55
<b>Figura 12:</b> Entalpia em função da concentração de carvacrol em cada lipídeo sólido, ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC).	56
<b>Figura 13:</b> Padrão de intensidade de espalhamento I(q) em função do vetor de espalhamento (q) para o ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%) 25% (AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente.	58
<b>Figura 14:</b> Parâmetro estrutural característico (espaçamento entre planos cristalinos, d) dos lipídeos sólidos (AE, CA e CC) em função do teor de carvacrol (10, 25% e 50%).	59
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografia ótica obtida através de MLP à temperatura ambiente correspondente ao ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 25% (A AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente. Imagens obtidas utilizando objetiva com aumento de 10X.	60
<b>Figura 16:</b> Representação gráfica da curva analítica do carvacrol através do método de quantificação no CLAE-UV em um comprimento de onda de 274 nm.	62



<b>Figura 17:</b> Representação gráfica de superfície-resposta (3D) do (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (PDI) e (c) potencial zeta em função da % de lipídeos e do EHL requerido do lipídeo sólido dos CLNs inertes e com carvacrol. ....	67
<b>Figura 18:</b> Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados: (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (IPD) e (c) potencial zeta em função da % de lipídeos e do EHL requerido do lipídeo sólido dos CLNs inertes e com carvacrol. ....	68
<b>Figura 19:</b> Representação gráfica de superfície-resposta (3D) do (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (IPD), e (c) potencial zeta e (d) eficiência de encapsulação (EE%) em função da % de lipídeos e % de tensoativos dos CLNs inertes e com carvacrol. ....	71
<b>Figura 20:</b> Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados: (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (IPD), e (c) potencial zeta e (d) eficiência de encapsulação (EE%) em função da % de lipídeos e % de tensoativos dos CLNs inertes e com carvacrol. ....	72
<b>Figura 21:</b> Estudo de estabilidade dos CLNs inertes e com carvacrol: a) diâmetro médio, b) IPD e c) potencial zeta. ....	73
<b>Figura 22:</b> Curvas de DSC do lipídeo sólido cera de abelha (a), do tensoativo poloxamer 188 (b), dos CLNs inertes (c) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/CRV) (d). ....	75
<b>Figura 23:</b> Difração de raios X do lipídeo sólido cera de abelha (a), do tensoativo poloxamer 188 (b), dos CLNs inertes (c) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/CRV) (d). ....	76
<b>Figura 24:</b> Perfil de liberação in vitro de carvacrol livre (CRV) ou encapsulado (CLNs c/CRV) após 24h de experimento. ....	77
<b>Figura 25:</b> Concentração citotóxica média (CC50) de células THP-1 diferenciadas depois de 48h de incubação com diferentes concentrações de carvacrol livre (CRV) ou encapsulado (CLNs c/ CRV), e miltefosina (MT). *p < 0,05, diferença estatística significativa. ....	79
<b>Figura 26:</b> Viabilidade in vitro das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 48h de tratamento com carvacrol, CLNs c/ CRV e miltefosina. ....	80
<b>Figura 27:</b> Cromatogramas de CLAE-FLD representativos de carvacrol e P.I. em solução (A), branco do plasma de rato (B), carvacrol e P.I. em plasma de rato (C). Os picos em 2.9 e 4.2 são o P.I. e o carvacrol, respectivamente. ....	81
<b>Figura 28:</b> Perfil farmacocinético in vivo após administração intravenosa em bolus (3 mg/kg) de carvacrol (CRV) livre e encapsulado (CLN contendo carvacrol) em ratos Wistar. ....	84
<b>Figura 29:</b> Representação esquemática da circulação enterohepática após administração oral de uma substância. ....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados da 1ª perda de massa ( $\Delta m$ ) referente às curvas TG das misturas físicas dos lipídeos sólidos (AE, CA e CC) com concentrações crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%).	54
<b>Tabela 2:</b> Dados de DSC relacionados a misturas binárias do carvacrol e os lipídeos sólidos (AE, CA e CC).	57
<b>Tabela 3:</b> Repetibilidade do método de quantificação do carvacrol por CLAE-UV.	63
<b>Tabela 4:</b> Precisão intermediária do analista 1 em dias diferentes do método de quantificação do carvacrol por CLAE-UV.	63
<b>Tabela 5:</b> Precisão intermediária do analista 2 em dias diferentes do método de quantificação do carvacrol por CLAE-UV.	63
<b>Tabela 6:</b> Valores obtidos da exatidão para o carvacrol por CLAE a 274 nm em três níveis de concentração (1, 10 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).	64
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros analíticos variáveis para determinação da robustez.	65
<b>Tabela 8:</b> Dados de DSC de $T_{\text{onset}}$ , $T_{\text{pico1}}$ e $T_{\text{pico2}}$ do ponto de fusão, entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) da cera de abelha (CA), CLNs inerte (CLNs) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/ CRV).	75
<b>Tabela 9:</b> Precisão e exatidão do método de quantificação do carvacrol em plasma de rato por CLAE-FLD.	82
<b>Tabela 10:</b> Estabilidade do carvacrol em plasma de rato expostas a diferentes condições de temperatura: temperatura ambiente (6h), $-80^{\circ}\text{C}$ (1 mês) e até três ciclos gela-degela.	82
<b>Tabela 11:</b> Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise não-compartimental do perfil farmacocinético in vivo após administração intravenosa de carvacrol (CRV) livre e encapsulado (CLN contendo carvacrol) em ratos Wistar.	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

CLNs: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

CRV: Carvacrol

DTNs: Doenças Tropicais Negligenciadas

OMS: Organização Mundial de Saúde

WHO: *World Health Organization*

NLS: Nanopartículas Lipídicas Sólidas

AE: Ácido esteárico

CA: Cera de Abelha

CC: Cera de carnaúba

MLP: Microscopia de Luz Polarizada

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial

TG: Termogravimetria

SAXS: Espalhamento de raios X a baixo ângulo

CLAE: Cromatografia líquida a alta eficiência

ACN: Acetonitrila

Cl: Clearance

UV: Ultravioleta

FLD: Detector de luz fluorescente

DPR: Desvio Padrão Relativo

THP-1: Linhagem celular de monócitos humanos.

CI<sub>50</sub>: Concentração Inibitória de 50% dos parasitas.

CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica a 50% das células.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio.

EE%: Eficiência de encapsulação

DRX: Difração de raios X

IPD: Índice de polidispersão

DLS: Espalhamento de luz dinâmico

MRT: Tempo de residência médio

CV: Coeficiente de variação.

DMSO: Dimetilsulfóxido

EHL: Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

LLOQ: *lower limit of quantification*

HAP: Homogeneização a alta pressão

CDC: *Center of Diseases and Control*

LV: Leishmaniose visceral

LC: Leishmaniose cutânea

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

TR: tempo de retenção

PLGA: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Leishmanioses.....	19
2.2 Monoterpeno fenólico - Carvacrol.....	24
2.3 Tratamento do leishmanioses e nanotecnologia .....	27
2.4 Nanopartículas Lipídicas .....	29
2.4.1 Métodos de Preparação de CLNs .....	32
2.4.2 Técnicas para caracterização de CLNs.....	34
2.4.3 Aplicação de nanopartículas lipídicas no tratamento de leishmanioses .....	36
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos .....	38
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1 Avaliação da influência do carvacrol na matriz lipídica.....	39
4.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	39
4.1.2 Termogravimetria (TG).....	39
4.1.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) .....	39
4.1.4 Microscopia de luz polarizada (MLP).....	40
4.2 Preparação dos CLNs.....	40
4.3 Planejamento Fatorial .....	41
4.3 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) .....	41
4.3.1 Condições cromatográficas .....	41
4.3.2 Validação do método.....	42
4.4 Caracterização dos CLNs.....	43
4.4.1 Diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta .....	43

4.4.2 Determinação da Eficiência de encapsulação (EE%) .....	43
4.4.3 Estabilidade dos CLNs .....	44
4.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	44
4.4.5 Difração de raios-X .....	44
4.5 Estudo da cinética de liberação <i>in vitro</i> do carvacrol a partir dos CLNs.....	45
4.6 Citotoxicidade <i>in vitro</i> em células THP-1 diferenciadas .....	46
4.7 Cultura de <i>Leishmania</i> .....	47
4.8 Viabilidade <i>in vitro</i> sobre formas promastigotas .....	47
4.9 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE/FLD) .....	48
4.9.1 Instrumentação e condições cromatográficas.....	48
4.9.2 Preparação das amostras e método de extração .....	48
4.9.3 Validação do método.....	49
4.10 Avaliação da farmacocinética <i>in vivo</i> .....	50
4.10.1 Animais .....	50
4.10.2 Farmacocinética <i>in vivo</i> .....	50
4.10.3 Análise dos dados farmacocinéticos .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 Avaliação da influência do carvacrol na matriz lipídica.....	52
5.1.1 Termogravimetria (TG).....	52
5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	54
5.1.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) .....	57
5.1.4 Microscopia de Luz Polarizada .....	59
5.5 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol por CLAE-UV ....	61
5.5.1 Seletividade .....	61
5.6.2 Linearidade.....	61
5.6.3 Precisão .....	62
5.6.4 Exatidão.....	64
5.6.5 Limite de detecção e de quantificação .....	64
5.6.6 Robustez .....	65
5.5 Caracterização das dispersões de CLNs .....	65
5.5.1 Influência da matriz lipídica na formação dos CLNs.....	65

5.5.2 Influência da concentração de lipídeos e tensoativo na formação dos CLNs e eficiência de encapsulação do carvacrol .....	69
5.6 Estabilidade dos CLNs.....	73
5.7 Caracterização dos CLNs: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	74
5.8 Caracterização dos CLNs: Difração de raios-X.....	75
5.7 Estudo de liberação do carvacrol a partir dos CLNs .....	76
5.8 Citotoxicidade <i>in vitro</i> em células THP-1 diferenciadas .....	78
5.9 Viabilidade <i>in vitro</i> sobre formas promastigotas .....	79
5.10 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol em plasma de rato por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE/FLD).....	80
5.10.1 Seletividade e sensibilidade .....	80
5.10.2 Linearidade.....	81
5.10.3 Precisão, exatidão e recuperação.....	81
5.10.4 Estabilidade do carvacrol no plasma .....	82
5.11 Avaliação da farmacocinética <i>in vivo</i> .....	83
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE B – RESUMO ACEITO PARA APRESENTAÇÃO EM PÔSTER NA 5TH NANOTODAY CONFERENCE (HAWAII-USA).....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE C– ARTICLE SUBMITTED AT INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (IN PRELO): “EFFECT OF CARVACROL ON THE CRYSTALLINITY PROFILE OF STEARIC ACID, BEESWAX AND CARNAUBA WAX AS MATERIALS FOR PRODUCTION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS” .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo que compreende diversas doenças infecciosas predominantes nas regiões mais pobres do mundo. Essas doenças são prevalentes nas áreas tropicais e subtropicais, devido a uma infraestrutura sanitária insuficiente. Estima-se que atualmente existam aproximadamente 20 DTNs prevalentes em 149 países afetando um bilhão de pessoas em todo mundo. Dentre as DTNs, há uma estimativa de que ocorram anualmente de 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose e de 20.000 a 30.000 mortes no mundo (WHO, 2018).

Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae e se manifesta em duas formas principais, tegumentar (cutânea ou mucocutânea) e visceral, também conhecida como calazar. A forma cutânea é caracterizada por úlceras e escaras que permanecem por um longo período de tempo pelo corpo. A leishmaniose visceral é a forma mais severa, caracterizada por febre prolongada, esplenomegalia e pancitopenia, podendo ocasionar até a morte se não tratada (TIUMAN et al., 2011).

Devido à dificuldade no controle do inseto vetor e à inexistência de vacina efetiva contra a doença, a quimioterapia torna-se uma das principais formas de tratamento para a leishmaniose. Nos últimos 70 anos, os antimoniais pentavalentes - estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) - têm sido utilizados como primeira linha de tratamento (OLLIARIO, BRCESON, 1993; PHAM LOISEAU, BARRATT, 2013). Outros fármacos utilizados incluem a Anfotericina B, Pentamidina e miltefosina (PHAM et al., 2014). Porém, estes medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose apresentam efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, toxicidade renal e hepática, dificultando a adesão terapêutica (PHAM; LOISEAU, BARRATT, 2013). Adicionalmente, as espécies de *Leishmania* têm demonstrado resistência a esses medicamentos (MEDEIROS et al., 2011). Além disso, os medicamentos utilizados para tratar a leishmaniose são de alto custo limitando assim, seu uso em países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento. Dessa forma, existe uma necessidade urgente de novas moléculas para o tratamento de leishmanioses.

Além da síntese de fármacos, a pesquisa de produtos naturais pode fornecer novas moléculas promissoras. Plantas medicinais e/ou vários dos seus metabólitos vêm sendo utilizados no tratamento de doenças, como por exemplo, o paclitaxel e alcaloides da vinca utilizados no tratamento de câncer, ou a artemisinina uma potente molécula contra a malária (POLONIO; EFFERTH 2008).



Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpene fenólico que apresenta atividades farmacológicas, tais como, analgésica (DE SOUSA, 2011), anti-inflamatória (GUIMARÃES et al., 2012), antimicrobiana (BELDA-GALBIS et al., 2014), antitumoral (ARUNASREE, 2010), antioxidante (BEENA & RAWAT, 2013; AESCHBACH et al., 1994) e leishmanicida. Acredita-se que, por possuir natureza hidrofóbica, o carvacrol tem a capacidade de preferencialmente incorporar na membrana celular e tornando-a permeável a prótons e íons, assim como afetando funções enzimáticas vitais dos microorganismos. Além disso, Silva et al., (2017) observaram que presença do grupo hidroxila ligado ao anel benzênico na molécula do carvacrol é importante na atividade anti-leishmania.

Melo et al. (2013) avaliaram a atividade anti-leishmania do carvacrol, que demonstrou concentração letal para inibir 50% das formas promastigotas de *L.chagasi* (CI<sub>50</sub>) de 2,3 µg mL<sup>-1</sup>. Em cepas de *L. amazonensis*, Pastor et al. (2015); e Monzote et al. (2014a) obtiveram CI<sub>50</sub> das formas promastigotas para o carvacrol de 15,3 ± 4,6 µg.mL<sup>-1</sup>. Além disso, estudos *in vivo* em camundongos demonstraram uma redução no tamanho da lesão, provocada pela leishmaniose cutânea, após a administração intralesional de 30 mg/kg do carvacrol uma vez ao dia por 15 dias, em relação ao grupo controle. (MONZOTE et al., 2014b).

Contudo, o carvacrol apresenta baixa solubilidade aquosa, devido à sua natureza lipofílica; facilidade de oxidação e volatilização, limitando sua aplicação terapêutica (SANTOS et al., 2015). A encapsulação de compostos hidrofóbicos, como o carvacrol, em carreadores coloidais é uma possível estratégia para contornar essas limitações (ALMEIDA et al., 2017; BRUNI et al., 2017). Além disso, especialmente os carreadores de tamanho nanométrico, têm a vantagem de serem facilmente internalizados pelos macrófagos, principal célula fagocítica hospedeira da leishmania. Os macrófagos expressam receptores que internalizam eficientemente nanopartículas na faixa de tamanho de 50 a 500 nm. A fagocitose, processo que possibilita a internalização de nanopartículas, pode favorecer um aumento da concentração intracelular, especificamente no vacúolo parasitário onde a leishmania está hospedada (BRUNI et al., 2017). Esse mecanismo pode favorecer o aumento da eficácia terapêutica pela liberação do fármaco ou composto ativo diretamente em órgãos ricos em macrófagos como medula óssea, fígado e baço (DE SOUZA et al., 2018; BRUNI et al., 2017).

Em especial em sistemas do tipo nanopartículas lipídicas, têm sido reportados por melhorar a eficiência terapêutica dos agentes leishmanicidas e antimaláricos conhecidos anfotericina B e orizalina respectivamente (LOPES et al., 2012). Além disso, a probabilidade de citotoxicidade de sistemas lipídicos nanoparticulados esperada é mínima, tendo em vista

que apresentam uma maior aceitação fisiológica em comparação com outros carreadores coloidais tais como nanopartículas poliméricas (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) consistem em sistemas obtidos a partir de mistura de lipídeo sólido e lipídeo líquido, permanecendo sólidos à temperatura ambiente e corporal. Devido a sua natureza nanoparticulada, o controle da liberação de fármacos devido ao estado sólido da matriz lipídica, o aumento da estabilidade de fármacos, baixa toxicidade, os CLNs são considerados sistemas de liberação promissores para administração parenteral e não parenteral de moléculas para o tratamento de leishmanioses (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2012; PARTIDAR et al., 2010).

Dessa forma, esse trabalho consiste no desenvolvimento de formulação parenteral de CLNs contendo carvacrol para o tratamento de leishmanioses. Nesse sentido foi realizada a avaliação da influência dos parâmetros de preparação dos CLNs como, a escolha do lipídeo sólido, concentração de tensoativo e lipídeos, bem como a sua estabilidade durante o tempo de armazenamenro. Além disso, o perfil de liberação do carvacrol a partir dos CLNs, o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, o ensaio de atividade leishmanicida e a farmacocinética *in vivo* do carvacrol em solução e encapsulado, foram avaliados.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Leishmanioses

A Leishmaniose é considerada uma das seis mais importantes doenças tropicais pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Há uma estimativa de que ocorram anualmente de 700.000 a 1 milhão de novos casos e de 20.000 a 30.000 mortes no mundo. No mundo, cerca de 310 milhões de pessoas em 98 países estão em áreas de risco de infecção por *Leishmania* (WHO, 2018).

Leishmaniose é uma doença infecciosa tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. Estima-se que mais 20 espécies de *Leishmania* possam ser transmitidas aos seres humanos através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). O desenvolvimento da doença é influenciado por fatores como, espécie de leishmania, interação parasito-hospedeiro, e vulnerabilidade do sistema imunológico do hospedeiro, sendo manifestada em três formas principais, cutânea, mucocutânea e visceral, também conhecida como calazar (SILVA et al., 2017). A razão média de incidência entre as formas cutânea e visceral, respectivamente a forma comum e a fatal, é aproximadamente 8 vezes (WHO, 2018; DE SOUZA et al., 2018).

A forma cutânea é uma das formas mais comuns de leishmaniose causando úlceras e escaras que permanecem por um longo período tempo pelo corpo (GOTO; LINDOSO, 2012). As lesões podem ou não se curar espontaneamente, sendo que a cura acontece em 90% dos casos de 3 a 18 meses (WHO, 2018). Em torno de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na porção leste e central da Ásia. Em 2015, mais de dois terços de novos casos de leishmaniose cutânea ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Estima-se que ocorram de 0,6 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea anualmente no mundo (WHO, 2018). As espécies causadoras de leishmaniose cutânea encontradas no Brasil são principalmente *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (GOTO; LINDOSO, 2012).

Já a manifestação mucocutânea da leishmaniose geralmente ocorre após meses ou anos da resolução de lesões causadas pela forma cutânea (HANDLER et al., 2015). Os sintomas iniciais são não específicos, tornando o diagnóstico difícil. Os sintomas podem incluir coceira no nariz que progride para a formação de crostas e sangramento (GOTO; LINDOSO, 2012). As lesões podem parcialmente ou totalmente causar danos severos às membranas mucosas do nariz, boca e garganta e os tecidos ao seu redor. Cerca de 90% da leishmaniose mucocutânea ocorre na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2018).

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais severa, na qual os parasitas migram para órgãos vitais. É uma doença severa e debilitante caracterizada por febre prolongada, perda de peso, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia (aumento de gamaglobulina no sangue) e pancitopenia (redução dos níveis de hemácias, leucócitos e plaquetas no sangue). Pacientes gradualmente tornam-se doentes em um período de poucos meses e podem morrer se não forem tratados (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). A LV é endêmica no subcontinente Indiano e leste da África. Estima-se que ocorram 50.000 a 90.000 novos casos de LV por ano em todo o mundo. Sendo que, em 2015, mais de 90% dos novos casos registrados ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2018).

Nas Américas, a leishmaniose cutânea e mucocutânea é endêmica em 18 países, sendo que no período de 2001-2016, 892.846 novos casos da forma cutânea foram reportados pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Em 2016, 48.915 casos das formas cutânea e mucocutânea foram reportados, e os países com maiores incidências foram o Brasil (12.690), Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e Peru (7.271) e juntos representam 74,3% do número total de casos na região. Já a forma visceral da leishmaniose é endêmica em 12 países das Américas. No período de 2001-2016, 55.530 casos foram reportados, com uma média anual de 3.457 casos. Aproximadamente 96% dos casos foram registrados no Brasil, entretanto, têm ocorrido uma expansão geográfica na Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela (OPAS, 2018).

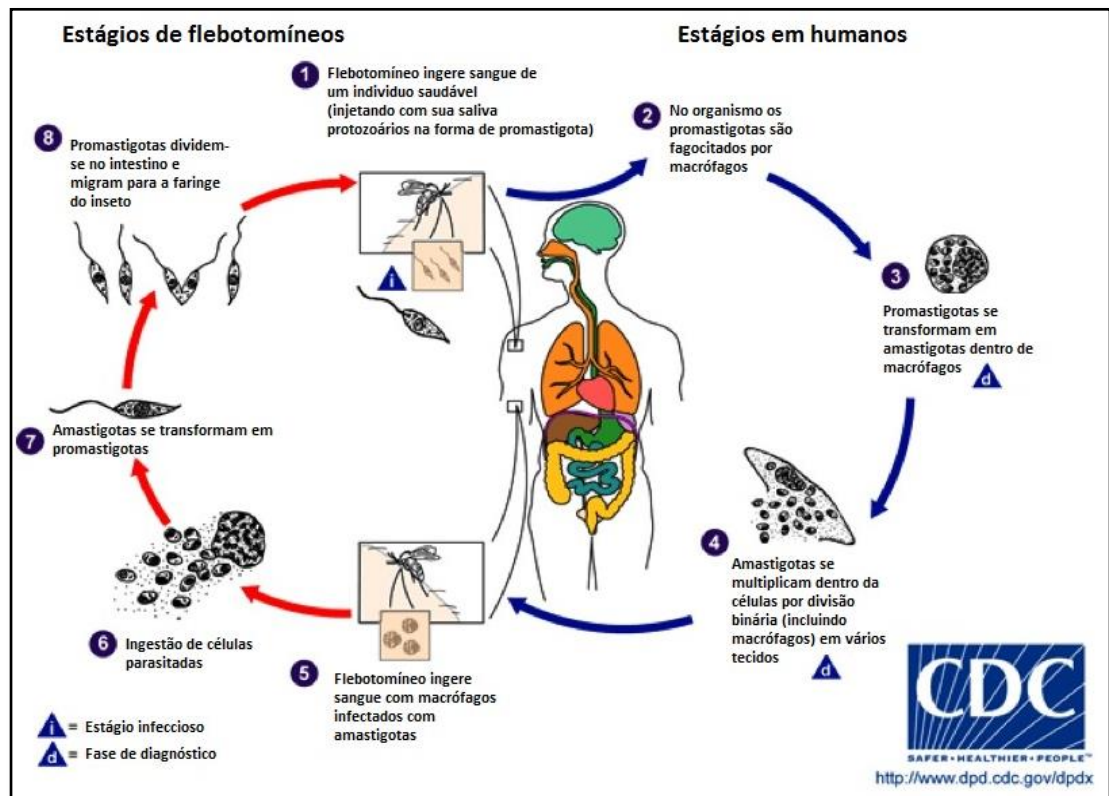
De acordo com a OMS, 25 países apresentaram elevada incidência para leishmanioses em 2015, sendo reportados mais de 100 casos da forma visceral para 2500 da forma cutânea. Destes países, o Brasil é o único país que apresenta elevada incidência para as duas formas de leishmanioses (WHO, 2016; DE SOUZA et al., 2018). No Brasil, no ano de 2016, foram registrados 3.200 casos de LV e 12.690 casos de LC, sendo que a região Nordeste foi a mais afetada pela LV com 1.523 (47,59%) dos casos e a região Norte foi a mais afetada pela LC com 5.075 (39,99%) dos casos registrados (MS, 2017a; MS, 2017b). Apesar de a região Nordeste ter registrado o maior número de casos de LV no Brasil em 2016, esse número sofreu uma redução de 25% em relação ao ano de 2014, diminuindo por consequência o número total reportado pelo Brasil em 2016. Entretanto, todas as outras regiões do país apresentaram um aumento de casos de LV. Para LC, todas as regiões apresentaram uma redução no número de casos em 2016 (DE SOUZA et al., 2018).

No estado de Sergipe, no período de 2000 a 2016, 885 casos de LV, e 315 casos de LC foram registrados. Apesar de o estado apresentar menor número de casos em relação a outros

estados do Nordeste, o índice de letalidade de LV em 2015 foi o maior da região (16,7) e o segundo maior do Brasil (MS, 2017a; MS, 2017b; MS, 2017c).

A leishmaniose é transmitida através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Durante o ciclo de vida (Figura 1), o parasita se apresenta em duas formas: a forma promastigota e amastigota.

**Figura 1:** Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*.



Fonte: *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* Adaptado.

As promastigotas são encontradas no inseto vetor e são injetadas na derme do hospedeiro mamífero durante seu repasto sanguíneo. No hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, células dendríticas e/ou neutrófilos atraídos pelo local da picada na pele. Uma vez no interior dos macrófagos, ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo (fagolisossomo) a partir da fusão do lisossomo com o fagossomo. Nesta organela ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, e estas se multiplicam. Com o grande número de amastigotas no meio intracelular, a célula se rompe, liberando-as e consequentemente infectando outras células. Dependendo de fatores como espécie do parasita e o sistema imunológico do hospedeiro, serão desenvolvidas manifestações clínicas de

leishmaniose cutânea ou visceral. Os flebotomíneos infectam-se durante o repasto sanguíneo pela ingestão de células infectadas. No inseto vetor, as amastigotas se transformam em promastigotas, se desenvolvem no intestino (no intestino posterior para o subgênero *Viannia*; e no intestino médio para organismo do subgênero *Leishmania*) e migram para a probóscide do inseto, onde são acumulados até serem injetados na derme do hospedeiro no próximo repasto sanguíneo (CDC, 2013; GOTO; LINDOSO, 2012).

O tratamento e prevenção da leishmaniose constitui um grande desafio mundial devido ao difícil controle do inseto e inexistência de vacina para humanos efetiva contra a doença. Portanto, a quimioterapia é uma das principais maneiras de controlar a leishmaniose. O tratamento clássico de leishmaniose requer a administração de fármacos que induzem efeitos indesejáveis aos pacientes (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; DEN BOER et al., 2011). Nos últimos 70 anos, os antimoniais pentavalentes - estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) - têm sido utilizados como primeira linha de tratamento (PHAM; LOISEAU, BARRATT, 2013; TIUMAN et al., 2011). Esses antimoniais são administrados pela via intravenosa ou intramuscular, e podem ocasionar efeitos adversos reversíveis como pancreatite química, elevação nas aminotransferases séricas e anormalidades eletrocardiográficas. A principal desvantagem da terapia é o surgimento de resistência dos antimoniais (POLONIO; EFFERTH 2008).

A segunda linha de tratamento de leishmanioses consiste na anfotericina B em formulação coloidal de micelas de deoxicolato de sódio (Fungizone<sup>®</sup>, 30 dias com 1 mg/kg, via intravenosa), formulação liposomal de anfotericina B (AmBisome<sup>®</sup>, dose única 10 mg/kg, via intravenosa), pentamidina (Pentam<sup>®</sup>, 3–5 dias com 4 mg/kg, via intravenosa), miltefosina (Impavido<sup>®</sup>, 28 dias com 1.5–2.5 mg/dia, via oral) e paramomicina (Humatin<sup>®</sup>, 21 dias com 15 mg/kg/day, via oral). Esses medicamentos ainda podem ser utilizados em combinação, o que pode melhorar a eficácia e tolerância e limitando a resistência do parasita ao fármaco (DE SOUZA, et al., 2018).

A anfotericina B apresenta alta atividade leishmanicida e sua administração resulta em menos falhas no tratamento (BEKHIT, et al., 2018). Entretanto, este fármaco apresenta inúmeros inconvenientes incluindo toxicidade renal, resistência e baixa biodisponibilidade oral, sendo administrada por via intravenosa (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007). Com o objetivo de reduzir esses inconvenientes, foram desenvolvidas formulações fosfolipídicas lipossomais contendo anfotericina B (AmBisome<sup>®</sup>) (PHAM et al., 2014). Essas formulações promovem um aumento da eficácia e redução da toxidade devido ao direcionamento do

fármaco ao sítio-alvo (POLONIO; EFFERTH 2008). A anfotericina B liposomal é composta de fosfolípídeos de alta temperatura de transição e colesterol, com a finalidade de incorporar a anfotericina B na bicamada liposomal. Após a liberação do fármaco dos lipossomas, é sugerido que o mesmo atravesse a membrana celular e se ligue ao ergosterol presente na membrana da leishmania. Uma vez que a anfotericina B forma poros aquosos na membrana plasmática, há um aumento da permeabilidade a cátions monovalentes e pequenos metabólitos. Além disso, esse fármaco tem demonstrado afinidade pelo colesterol das células de macrófagos (hospedeiras), o que facilita sua internalização, permitindo uma maior tolerância de dose e menos efeitos colaterais (DE SOUZA, et al., 2018; TAN et al., 2010).

Na administração parenteral de Anfotericina B através de solução de micelas mistas, apesar de ser eficaz no tratamento de leishmanioses, podem ocorrer efeitos adversos tais como, hemólise e nefrotoxicidade. Portanto na administração parenteral da formulação liposomal de Anfotericina B, não só ocorre uma melhora no desempenho terapêutico como também uma diminuição nos efeitos adversos. Isso claramente mostra que o desenvolvimento de sistemas carreadores pode melhorar o desempenho terapêutico de fármacos como a Anfotericina B (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007; BEKERSKY et al., 1999).

O medicamento AmBisome<sup>®</sup> administrado pela via intravenosa para tratar leishmaniose visceral têm apresentado 95% de cura, quando utilizado em monoterapia (SUNDAR et al., 2010). Entretanto, mesmo com alto índice de cura, a necessidade de repetidas administrações parenterais e o alto custo do tratamento com AmBisome<sup>®</sup>, limitam seu uso em pacientes de países em desenvolvimento (NO et al., 2016). Apesar das negociações entre a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Gilead, fabricante do AmBisome<sup>®</sup>, para reduzir o preço do tratamento (\$18 por ampola), o tratamento continua caro (MEHEUS et al., 2010).

O fármaco miltefosina (hexadecilfosfocolina ou HePC) foi desenvolvido como agente antineoplásico oral para tratamento de câncer de pele (PAPAGIANNAROS et al., 2005). Posteriormente, foi descoberta sua atividade terapêutica contra *Leishmania*, sendo considerado como primeiro tratamento por via oral aprovado contra *Leishmania* (PHAM et al., 2014). A miltefosina tanto pode ser utilizada para o tratamento de leishmaniose visceral, quanto para a cutânea, incluindo infecções resistentes aos antimoniais pentavalentes, sendo considerado fármaco de escolha quando há falha no tratamento, o que ocorre especialmente em pacientes imunodeprimidos (TIUMAN et al., 2011).

Apesar do sucesso da miltefosina no tratamento de leishmaniose visceral fatal, e da facilidade do tratamento por via oral, o fármaco disponível no mercado é insuficiente devido à ineficiência do seu fornecimento, dificultando o acesso da população (SUNYOTO et al., 2018). Além disso, devido a sua teratogenicidade, longo período de tratamento e alto potencial de resistência, seu uso tem diminuído (BEKHIT, et al., 2018).

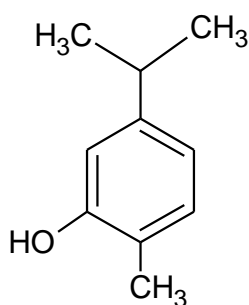
Tendo em vista as limitações e desvantagens do tratamento da leishmaniose, novas moléculas com uma toxicidade reduzida e um menor potencial de causar resistência, poderão melhorar o tratamento. Além da síntese racional de fármacos, a pesquisa de produtos naturais pode fornecer novas moléculas promissoras. Vários compostos derivados de espécies vegetais têm sido utilizados como tratamento padrão, como por exemplo, o paclitaxel e alcaloides da vinca utilizados no tratamento de câncer, ou a artemisinina como um potente fármaco contra a malária (POLONIO; EFFERTH 2008).

Entre os produtos naturais, os monoterpenos destacam-se pelo seu vasto uso na indústria, além de apresentarem atividade biológica contra fungos, bactérias, vírus e parasitas, incluindo protozoários (SILVA, et al., 2017). Alguns monoterpenos têm demonstrado atividade contra *leishmania*, como por exemplo, o limoneno, o linalool, o carvacrol e o timol (CAMARGOS, et al., 2014; POLONIO; EFFERTH 2008).

## 2.2 Monoterpeno fenólico - Carvacrol

Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) (Figura 2) é um monoterpeno fenólico presente em óleos essenciais produzidos por uma grande variedade de plantas aromáticas como, por exemplo, cominho preto (*Nigella sativa* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), entre outros (SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2012).

**Figura 2:** Estrutura química do carvacrol.



Fonte: Próprio autor.



Vários estudos recentes têm demonstrado que o carvacrol apresenta atividades farmacológicas, tais como, analgésica (DE SOUSA, 2011), anti-inflamatória (GUIMARÃES et al., 2012), antimicrobiana (BELDA-GALBIS et al., 2014), antitumoral (ARUNASREE, 2010), antioxidante (BEENA & RAWAT, 2013; AESCHBACH et al., 1994) e leishmanicida (SILVA et al., 2017; MELO et al., 2013).

O potencial antimicrobiano do carvacrol relatado na literatura é maior que outros compostos voláteis presentes em óleos essenciais, provavelmente devido à presença de um grupo hidroxila livre e uma porção fenólica em sua molécula, sua alta hidrofobicidade e alto coeficiente de partição octanol-água (3,64). O carvacrol demonstrou ser efetivo contra microorganismos patogênicos transmitidos por alimentos, incluindo *E. coli*, *Salmonella* e *B. cereus* e também contra fungos inibindo a formação de biofilmes, como exemplo a *Candida*. Além disso, vários estudos têm destacado a atividade anticancerígena do carvacrol *in vitro* em que a expressão dos genes caspase-3, PARP, e Bcl-2 talvez estejam envolvidos nos mecanismos de apoptose celular (SHARIFI-RAD et al., 2018).

Também têm sido reportado que o carvacrol é efetivo contra a leishmania. Melo et al. (2013) avaliaram a atividade leishmanicida, utilizando cepas de *L. chagasi*, do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer e dos seus componentes majoritários, os monoterpenos timol e carvacrol, os quais demonstraram concentração letal para inibir 50% das formas promastigotas ( $CI_{50}$ ) de 86,32; 9,8 e 2,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Sendo que a  $CI_{50}$  do carvacrol foi próxima àquela apresentada pela Anfotericina B (0,51  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), um dos medicamentos comerciais utilizados para o tratamento da leishmaniose.

Pastor et al. (2015); e Monzote et al. (2014), utilizando cepas de *L. amazonensis*, obtiveram  $CI_{50}$  das formas promastigotas de  $15,3 \pm 4,6 \text{ ug.mL}^{-1}$  no tratamento com carvacrol. Além disso, também foi reportado por Monzote et al. (2014a) a atividade do carvacrol sobre as formas amastigotas do parasito  $CI_{50}$  de  $13,6 \pm 1,8 \text{ ug.mL}^{-1}$ . Os mesmos autores em outro trabalho também realizaram estudos *in vivo* em camundongos e observaram uma redução no tamanho da lesão, provocada pela *L. amazonensis*, após a administração intralesional de 30 mg/kg do carvacrol uma vez ao dia por 15 dias, em relação ao grupo controle. Essa redução do tamanho da lesão foi semelhante ( $p > 0.05$ ) aos animais tratados com glucantime (fármaco utilizado como controle positivo) (MONZOTE et al., 2014b).

Já Farias-Junior et al. (2012) demonstraram que óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham, ricos nos monoterpenos carvacrol e timol apresentaram atividade significativa contra formas promastigotas de *L. chagasi*. Nesse estudo, também foi possível concluir que óleo

essencial rico em carvacrol foi mais efetivo, com  $CI_{50}/72h$  de  $54.8 \text{ ug.mL}^{-1}$  em comparação ao óleo essencial rico em timol com  $CI_{50}/72h$  de  $74.1 \text{ ug.mL}^{-1}$ .

Pastor, et al. (2015) atribuíram a atividade dos monoterpenos timol e carvacrol, presentes no óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS), ao fato de que estes, por possuírem natureza hidrofóbica, têm a capacidade de preferencialmente incorporar na membrana celular, perdendo sua alta impermeabilidade a prótons e íons, assim como outras funções enzimáticas vitais. Além disso, foi observada a acumulação de gotículas de lipídeo no citoplasma das promastigotas de *L. amazonensis*, sugerindo que o OELS teve um efeito adicional sobre o metabolismo lipídico do parasita. Já Monzote et al., (2018) reportaram que o carvacrol não atuaria diretamente inibindo a cadeia de transporte de elétrons da *leishmania* e que provavelmente estaria atuando em outra via.

A importância da presença do grupo hidroxila ligado ao anel benzênico na molécula do carvacrol, timol, *p*-cimeno e mentol na atividade leishmanicida foi demonstrada no estudo de Silva et al., (2017). Foi observado que o *p*-cimeno, a molécula precursora do timol e carvacrol e que não possui o grupo hidroxila ligado ao anel benzênico, não apresentou atividade contra *L. amazonensis*, diferentemente dos seus derivados hidroxilados, que apresentaram melhores resultados. Também foi observado que o mentol, que possui o grupo hidroxila, mas não possui o anel aromático, apresentou uma atividade menor que a dos monoterpenos fenólicos. Esses resultados sugeriram que a ausência do grupo hidroxila polar e/ou ausência do anel benzênico podem tornar os monoterpenos pouco ativos ou inativos contra leishmania.

Assim, como a maioria dos óleos essenciais e seus componentes majoritários, o carvacrol apresenta baixa solubilidade aquosa, devido à sua natureza lipofílica; facilidade de oxidação e volatilização, as quais podem limitar sua aplicação em um produto leishmanicida viável para administração (SANTOS et al., 2015). Além disso, a sua baixa solubilidade aquosa pode comprometer sua distribuição no organismo através da corrente sanguínea. A solubilização de compostos hidrofóbicos, como o carvacrol, em carreadores coloidais é uma possível estratégia para contornar essas limitações (ALMEIDA et al., 2017; BRUNI et al., 2017).

Apesar da encapsulação em sistemas micrométricos ser uma alternativa bem descrita para prevenir a degradação e a perda por volatilização, os sistemas nanométricos têm a vantagem de serem capazes de permear facilmente através de membranas e barreiras

biológicas (DE MATOS; LUCCA, KOESTER, 2019). Particularmente, no tratamento de leishmanioses, os carreadores de tamanho nanométrico, tais como lipossomas e nanopartículas, se destacam, pois são capazes de serem absorvidos pelas células fagocíticas infectadas por *Leishmania* (PHAM; LOISEAU, BARRATT, 2013). Nessa perspectiva, esses sistemas carreadores nanométricos têm demonstrado um bom potencial em melhorar a eficácia e tolerabilidade de alguns agentes anti-parasitários. A anfotericina B lipossomal é um bom exemplo de medicamento já em comercialização, utilizando esses sistemas carreadores nanométricos (DATE et al., 2007).

### **2.3 Tratamento de leishmanioses e nanotecnologia**

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanocarreadores como sistema de liberação de fármacos têm fornecido importantes avanços no tratamento de leishmanioses. Isso porque um dos maiores desafios no tratamento das leishmanioses reside no fato de que a leishmania infecta o macrófago, e, portanto os fármacos tradicionais utilizados no tratamento têm dificuldade de serem internalizados e assim atuar contra o parasita (BRUNI et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2016). Sendo assim, o principal objetivo dos estudos recentes centra-se no desenvolvimento de um novo nanocarreador com tamanho de partícula adequado e que proporcione uma liberação controlada dos compostos ativos a fim de direcioná-los ao sítio de ação na sua dose terapêutica ótima (AKBARI et al., 2017).

Especialmente no tratamento de leishmanioses, esses sistemas nanométricos têm a vantagem de serem facilmente internalizados pelos macrófagos, principal célula fagocítica hospedeira da leishmania. Os macrófagos expressam receptores que internalizam eficientemente nanopartículas na faixa de tamanho de 50 a 500 nm. A fagocitose, processo que possibilita a internalização de nanopartículas, pode favorecer um aumento da concentração intracelular, especificamente no vacúolo parasitário onde a leishmania está hospedada (BRUNI et al., 2017). Esse mecanismo pode favorecer o aumento da eficácia terapêutica pela liberação do fármaco ou composto ativo diretamente em órgãos ricos em macrófagos como medula óssea, fígado e baço (DE SOUZA et al., 2018; BRUNI et al., 2017).

Além das vantagens como o aumento da eficácia terapêutica e menor potencial de toxicidade, os nanocarreadores podem atuar na melhoria das propriedades farmacocinéticas, como biodisponibilidade, na proteção de fármacos do metabolismo, aumentando assim seu tempo de residência médio no organismo e, portanto prolongando o tempo de administração dos medicamentos (ALMEIDA et al., 2017).

Na última década, vários estudos têm proposto nanocarreadores como sistemas de liberação utilizando nanopartículas metálicas, lipídicas e poliméricas, além de lipossomas e nanocristais, como estratégia para a melhoria da eficácia e segurança no tratamento de leishmanioses (DE SOUZA, et al., 2018; ALMEIDA et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2016).

A maioria das nanopartículas de interesse farmacêutico é obtida a partir de polímeros orgânicos (biodegradáveis ou não), porém sistemas inorgânicos e materiais híbridos (orgânico-inorgânico) também têm atraído interesse na área farmacêutica. Nanopartículas de sílica, nanoestruturas de hidroxiapatita, nanopartículas metálicas têm sido estudadas tanto para diagnóstico quanto para tratamento de doenças (BRUNI et al., 2017).

Uma das vantagens da utilização de nanopartículas metálicas no tratamento de leishmanioses é a possibilidade da melhoria nas propriedades inerentes dos metais nobres, devido ao aumento de área superficial do metal na forma nanoparticulada. Como exemplo de melhoria nas propriedades dos metais nobres, a prata nanoparticulada tem a habilidade de produzir espécies reativas de oxigênio que possuem um efeito antibacteriano bem conhecido e as leishmanias parecem ser muito sensíveis também (GUTIERREZ et al., 2016). Allahverdiyev et al. (2011) observaram a inibição de formas amastigotas de *L. tropica*, e na presença de luz UV, o efeito foi mais significativo.

Jebali e Kazemi (2013) avaliaram a atividade anti-leishmania de algumas nanopartículas de prata (AgNPs), ouro (AuNPs), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>NPs), óxido de zinco (ZnONPs) e óxido de magnésio (MgONPs) em *L. major* sobre luz UV, infravermelho e no escuro. Nesse estudo, um aumento da atividade anti-leishmania foi observada para AgNPs, seguido por AuNPs, TiO<sub>2</sub>NPs, ZnONPs, e MgONPs. Também foram observadas que ambas as luzes UV e infravermelho melhoraram a atividade anti-leishmania dessas nanopartículas.

Outro sistema de liberação nanométrico utilizado no tratamento de leishmanioses são as nanopartículas poliméricas. As vantagens desses nanocarreadores são a sua baixa toxicidade, a sua biodegradabilidade, seu pequeno tamanho (< 1µm), a possibilidade de funcionalização da superfície, bem como a coadministração com outros fármacos. Os polímeros mais utilizados na preparação de nanopartícula polimérica, para o tratamento de leishmanioses, são o PLGA e a quitosana (GUTIERREZ et al., 2016).

Nanopartículas poliméricas tem a capacidade de modular a liberação de fármacos e também podem ser funcionalizadas com a finalidade de melhorar o direcionamento da

substância ativa, a biocompatibilidade e estabilidade no meio biológico (DE SOUZA et al., 2018). Além disso, comparado com outros sistemas nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas são mais estáveis, ou seja, o extravasamento do fármaco anterior a internalização pelo macrófago pode ser evitado (GUTIERREZ et al., 2016).

Van de Ven et al. (2011) demonstraram que após o encapsulamento de  $\beta$ -escina em nanopartículas de PLGA a  $CC_{50}$  (concentração citotóxica que causa 50% de morte celular) aumentou em comparação com a  $\beta$ -escina pura. Além disso, foi possível observar uma eficiente captação das nanopartículas pelos macrófagos resultando em uma melhora significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade anti-leishmania no modelo de macrófago ex vivo ( $CI_{50}$ ,  $1,04 \pm 0,23 \text{ g.mL}^{-1}$  vs.  $1,55 \pm 0,32 \text{ g.mL}^{-1}$  para a  $\beta$ -escina livre). Em relação ao índice de seletividade, o tratamento das células com as nanopartículas contendo a  $\beta$ -escina possibilitou um aumento de 4 ( $\beta$ -escina livre) para 18. Já Moreno et al. (2015) reportaram que a incorporação da  $\beta$ -lapachona em nanopartículas de lecitina-quitosana para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea (ratos BALB/c infectados por *L. major*) melhorou o índice de seletividade (11,3) em relação à  $\beta$ -lapachona livre (9,1).

Em especial em sistemas do tipo nanopartículas lipídicas, têm sido reportados por melhorar a eficiência terapêutica dos agentes leishmanicidas e antimaláricos como anfotericina B e orizalina, respectivamente (LOPES et al., 2012). Além disso, a probabilidade de citotoxicidade de sistemas lipídicos nanoparticulados esperada é mínima, tendo em vista que apresentam uma maior aceitação fisiológica em comparação com outros carreadores coloidais tais como nanopartículas poliméricas (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007). Todavia, alguns estudos citados na literatura indicam que a citocompatibilidade de nanopartículas lipídicas é regida pela matriz lipídica e o tipo de tensoativo utilizados em sua preparação (SCHOELER et al., 2001; SCHOELER et al., 2000). Dessa forma, nanopartículas lipídicas podem ser consideradas promissoras como sistemas de liberação de fármacos anti-leishmania.

## 2.4 Nanopartículas Lipídicas

Nos últimos anos, a nanotecnologia forneceu novas perspectivas em vários campos da ciência. Partículas de tamanho nanométrico têm sido utilizadas no tratamento e diagnóstico de doenças graças à vasta melhoria nas propriedades físicas, químicas e mecânicas (ABAMOR et al. 2016; PRADOS et al., 2014; QASIM et al., 2014).

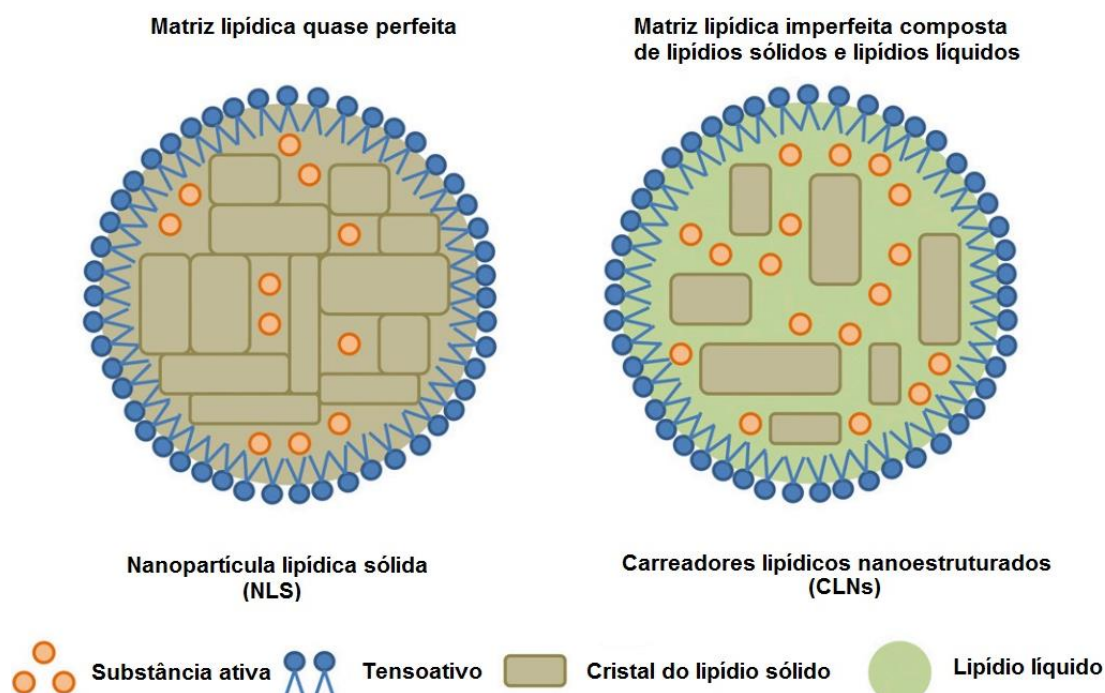
Comparado a outros sistemas como lipossomas e emulsões, partículas sólidas apresentam algumas vantagens, como por exemplo, a proteção dos fármacos incorporados contra a degradação e maior flexibilidade na liberação destes fármacos (MEHNERT; MÄDER, 2012). As vantagens de formulações de lipossomas e emulsões são que elas são formadas por excipientes bem tolerados e que podem ser facilmente produzidos em larga escala a depender do processamento, sendo estes pré-requisitos para que o produto seja introduzido no mercado (MEHNERT; MÄDER, 2012; MÜLLER et al., 2007).

No início dos anos 90, três grupos de pesquisa em especial os de Müller (SCHWARZ et al., 1994; FREITAS; LUCKS; MÜLLER, 1994), Gasco (CAVALLI et al., 1997; MOREL et al., 1996) e Westesen (SIEKMANN; WESTESEN, 1994) focaram no desenvolvimento de um sistema carreador alternativo aos lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas, as chamadas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). NLS consiste em uma classe de partículas coloidais compostas de lipídeos, permanecendo sólida a temperatura ambiente e corporal. Os pesquisadores têm explorado o fato de que a utilização de lipídeos sólidos ao invés de líquidos talvez forneça uma liberação controlada, pois a mobilidade do fármaco na matriz sólida é substancialmente menor se comparado a um lipídeo líquido. Além disso, esses sistemas carreadores são compostos de lipídeos fisiologicamente tolerados, os quais são dispersos em água e tensoativos (GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016; SEVERINO et al., 2012).

A maioria dos trabalhos publicados na década de 90 relacionados à NLS visava exclusivamente em aplicações farmacêuticas, principalmente em rotas de administração oral e parenteral. Entretanto na última década, as NLS começaram a ser utilizadas em formulações tópicas, não apenas para produtos farmacêuticos, mas também para produtos cosméticos (PARTIDAR et al., 2010).

Na segunda geração de nanopartículas lipídicas, denominadas carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), as partículas são obtidas através de uma mistura de lipídeo sólido e lipídeo líquido ou semissólido, sendo estes sólidos a temperatura ambiente e corporal (MÜLLER et al., 2007) (Figura 3).

Figura 3: Nanopartículas lipídicas: Nanopartícula lipídica sólida (NLS) e Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs).



Fonte: Yingchoncharoen, Kalinowski e Richardson, 2016 Adaptado.

A finalidade dos CLNs é a obtenção de partículas nas quais o óleo ou gordura (lipídeo líquido ou lipídeo semissólido) é incorporado no lipídeo sólido. Isso aumenta a capacidade de incorporação do fármaco, pois este possui uma maior afinidade pelo óleo do que pelo lipídeo sólido (TAMJIDI et al., 2013). Além disso, a utilização da mistura de lipídeo sólido e líquido nos CLNs retarda a transição polimórfica e diminui o índice de cristalinidade, aumentando tanto a estabilidade do sistema, como a eficiência de encapsulação (MARCATO, 2009; MÜLLER et al., 2007; MÜLLER et al., 2000).

As principais vantagens desses sistemas do tipo CLNs incluem a proteção contra a degradação química de substâncias lábeis, o controle da liberação de fármacos devido ao estado sólido da matriz lipídica, o aumento da estabilidade de fármacos, baixa toxicidade, e transposição para larga escala e biocompatibilidade (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2012; PARTIDAR et al., 2010; SEVERINO et al., 2012).

Os CLNs apresentam algumas desvantagens, tais como, presença simultânea de estruturas coloidais alternativas (micelas, lipossomas e nano cristais de fármaco), e transições polimórficas. Estas podem ser prevenidas ou evitadas, através da escolha adequada e concentração dos componentes (lipídeos e tensoativos) e metodologia de preparação, utilizados (MEHNERT; MÄDER, 2012; PARTIDAR et al., 2010).

### 2.4.1 Métodos de Preparação de CLNs

Os principais métodos de preparação de CLNs reportados na literatura são a homogeneização a alta pressão (HAP), método de difusão do solvente e o método de diluição de microemulsão a quente. A HAP constitui um método vantajoso para preparar CLNs, uma vez que não apresenta dificuldades de transposição de escala e permite a obtenção de CLNs em condições assépticas. Homogeneizadores à alta pressão atuam impulsionando um fluido em alta pressão (100-2000 bar) através de um estreito orifício ( $\leq 25\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$ ). O fluido acelera a uma distância muito curta a uma alta velocidade (acima de 1000 km/h). Com alta tensão de cisalhamento e as forças de cavitação as partículas são perturbadas de tal modo a reduzir o seu tamanho à escala nanométrica (MARCATO, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012).

Duas técnicas básicas têm sido utilizadas para a produção de CLNs a partir de HAP: a homogeneização à quente e à frio. A homogeneização à quente é realizada a temperaturas acima do ponto de fusão do lipídeo. Uma pré-emulsão do lipídeo e do fármaco, se for o caso, são fundidos e vertidos sob uma fase aquosa emulsionante (mesma temperatura) e submetidos a um dispositivo de agitação com elevado cisalhamento (Ultraturrax<sup>®</sup>). A pré-emulsão é levada a HAP, podendo ser repetida várias vezes. O produto resultante da homogeneização a quente é uma nanoemulsão devido ao estado líquido do lipídeo. Partículas sólidas são formadas pelo posterior arrefecimento da amostra a temperatura ambiente ou a temperaturas inferiores (MARCATO, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012).

Em contraste, na técnica de homogeneização a frio o fármaco é dissolvido no lipídeo fundido com ou sem tensoativo. Em seguida, esta mistura é solidificada em nitrogênio líquido ou gelo seco, levando a formação de uma solução sólida, na qual é realizada moagem para formação de micropartículas (50 a 100  $\mu\text{m}$ ) e essas micropartículas, então, são dispersas em uma solução fria de tensoativos formando uma pré-suspensão. Essa pré-suspensão é homogeneizada à temperatura ambiente ou inferior.

Entretanto, a homogeneização a alta pressão, apresenta alguns pontos críticos nas condições de processo, tais como elevada temperatura necessária, elevada pressão, necessidade de altas concentrações de tensoativo, sendo este último indesejável em produtos farmacêuticos e alimentícios, devido à possibilidade de toxicidade (HU et al., 2005).

O método de difusão do solvente consiste em um método fácil, executável em poucas etapas, e que não requer nenhum equipamento especial. A obtenção de CLNs pelo método de difusão do solvente é baseada na metodologia de emulsificação com difusão do solvente para a preparação de nanoesferas poliméricas. Esta foi descrita por Kawashima et al. (1998), e



consistiu na dissolução do polímero D,L-lactídeo-co-glicolídeo em um solvente orgânico miscível em água, seguido do processo de cisalhamento para redução do tamanho de partícula.

Entretanto, ao contrário dos polímeros, os lipídeos sólidos não são capazes de solubilizar completamente a temperatura ambiente. Então, HU et al. (2002) adaptaram o método de Kawashima et al. (1998) para a preparação de NLS, utilizando uma temperatura adequada para a solubilização do lipídeo. Em 2005, HU et al., baseados em sua publicação anterior (2002), desenvolveram CLNs a partir do lipídeo sólido ácido esteárico e o lipídeo líquido ácido oleico. Os principais inconvenientes deste método de preparação é o uso de solvente orgânico e a falta de relatos de produção em larga escala (HEJRI et al., 2013; HU et al., 2006).

Outro método de preparação de CLNs reportado na literatura é o método baseado na diluição de microemulsões a quente. Gasco et al. (1993) foram os pioneiros no desenvolvimento de nanopartículas lipídicas baseados nessa metodologia de preparação. Esse método possui a vantagem de não necessitar do uso de solventes orgânicos. Para a obtenção de CLNs, primeiramente, uma microemulsão à quente é preparada por agitação, contendo essencialmente o lipídeo sólido fundido, o tensoativo e o co-tensoativo. Esta microemulsão à quente é, então dispersa sobre água resfriada à 2-3°C sob agitação a uma razão de diluição microemulsão:água previamente determinada (MARGULIS-GOSHEN E MAGDASSI, 2013).

O processo de diluição e a estrutura da gotícula são criticamente determinados pela composição da microemulsão. O elevado gradiente de temperatura utilizado para obtenção de nanopartículas lipídicas a partir de microemulsões promove uma rápida cristalização dos CLNs o que previne a agregação durante o processo de obtenção. Devido a etapa de diluição, a concentração de CLNs obtidos será menor quando comparado àqueles obtidos através dos demais métodos (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Fadda et al. (2013) desenvolveram microemulsões utilizando como lipídeo sólido tripalmitina e estabilizantes como lecitina, butanol e taurocolato de sódio. Essas microemulsões a quente foram empregadas como material de partida para obtenção de NLS com diâmetro médio menor que 150 nm e estreita distribuição de tamanho. Além disso, concluíram que microemulsões a quente O/A e bicontínua permitiram a formação de NLS com características adequadas de diâmetro médio de partícula, distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta, o que não foi possível observar quando foi utilizada microemulsão A/O como material de partida (pré-emulsão).

Baboota et al. (2009) obtiveram NLS contendo carvedilol com diâmetro médio de partícula o intervalo de 120 a 200 nm a partir de uma microemulsão O/A a quente utilizando como lipídeo sólido o ácido esteárico, como tensoativos poloxamer 188 e taurocolato de sódio e co-tensoativo o etanol.

Sendo assim, a escolha do método de preparação é fundamental para obtenção de CLNs com tamanho, carga, cristalinidade e morfologia adequadas para a sua aplicação. Portanto, para definir essas características, algumas técnicas de caracterização podem ser utilizadas.

#### **2.4.2 Técnicas para caracterização de CLNs**

Uma caracterização adequada dos CLNs é necessária para o controle de qualidade do produto final. Os métodos de caracterização devem ser sensíveis para identificar os parâmetros que indicam a qualidade dos CLNs. Sendo assim, os métodos mais empregados para avaliação e caracterização das CLNs são: tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD), Potencial zeta, análise térmica, Difração de raios-X (DRX), Microscopia eletrônica de transmissão (MET) (MEHNERT; MÄDER, 2012).

O tamanho médio das partículas e sua distribuição (índice de polidispersão) são parâmetros muito importantes, pois são determinantes para a estabilidade física, solubilidade, atividade biológica, taxa de liberação, turbidez e estabilidade química. Dependendo do método de obtenção dos CLNs, o tamanho da partícula será influenciado por uma série de fatores como, a cinética de adsorção do emulsificante, tensão interfacial entre as fases dispersa e dispersante, viscosidade entre fases e energia mecânica empregada para “quebrar” as gotículas (TAMJIDI et al., 2013).

Estes parâmetros podem ser mensurados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também chamado de espalhamento dinâmico de luz (DLS). PCS ou DLS consiste na análise das flutuações de intensidade de luz espalhada em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o movimento da partícula, movimento este que é a causa das flutuações de intensidade. E é a partir deste princípio que o DLS pode ser utilizado para determinar parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (IPD) (ENOKI, 2010). Valores de IPD de 0,1-0,25 demonstram uma distribuição de diâmetro médio das partículas bastante estreito, enquanto que valores de IPD acima de 0,5-1,0 indicam uma ampla distribuição, a qual tende a um sistema polidisperso (LAKSHMI; KUMAR, 2010).

O PCS ou DLS abrange um intervalo de poucos nanômetros até cerca de 3  $\mu\text{m}$ , ou seja, não é capaz de detectar partículas de tamanho elevado. Entretanto, outra técnica, denominada difração a laser (LD) é capaz de mensurar o tamanho de partícula numa faixa de 0,05-80  $\mu\text{m}$  até 2000  $\mu\text{m}$  (TAMJIDI et al., 2013; MEHNERT; MÄDER, 2012).

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é o potencial elétrico o qual pode ser definido a partir da superfície de cisalhamento (dupla camada difusa) da partícula abaixo da qual os contra-íons permanecem anexados fortemente à partícula quando esta se move em um campo elétrico. É uma medida indireta da estabilidade física do CLN, ou seja, para desenvolver uma nanodispersão com boa estabilidade é desejável um potencial zeta  $\zeta$  ( $>|30|$  mV) (LAKSHMI; KUMAR, 2010; MITRI et al., 2011; TAMJIDI et al., 2013).

Todavia, instrumentos analíticos baseados em PCS e LD estimam o tamanho da partícula, assumindo que as partículas possuem um formato esférico. Porém, a maioria das nanopartículas lipídicas assumem o formato não-esférico. Além disso, a agregação (floculação e coalescência parcial) das partículas de CLNs se ocorrerem, não será detectada por essas técnicas. Tendo em vista essas limitações, se fazem necessários métodos adicionais de análise para fornecer informações diretas sobre as nanopartículas lipídicas. Embora a microscopia óptica possa ser usada para monitorar a presença de partículas grandes e cristais de fármaco não solubilizados, esta técnica não é útil para a visualização de partículas de tamanho abaixo de 500 nm (KLANG et al., 2012; TAMJIDI et al., 2013).

Desta forma, técnicas de microscopia como, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), são frequentemente utilizadas para fornecer informações a respeito da forma, distribuição de tamanho, morfologia, topografia da superfície e até mesmo a estrutura interna das nanopartículas lipídicas.

A MEV fornece informações sobre a morfologia em três dimensões e informações de superfície da amostra (DOMINGO; SAURINA, 2012). A maior vantagem desse tipo de microscopia é a alta profundidade de campo, ou seja, imagens de estruturas relativamente grandes permanecem em foco, contudo, o poder de resolução é mais baixo que a MET (KLANG et al., 2012; TAMJIDI et al., 2013). A MET por sua vez, fornece imagens em duas dimensões e geralmente a amostra deve estar marcada com metais pesados para a visualização, pois a amostra é detectada por diferença de densidade eletrônica. Essa técnica pode fornecer informações sobre a estrutura interna das nanopartículas lipídicas, pois possui um alto poder de resolução. Uma desvantagem desse tipo de microscopia é que a preparação da amostra é complexa, se comparado ao MEV (DOMINGO; SAURINA, 2012; KLANG et al., 2012; MARCATO, 2009; SWARBRICK, 2007).

As alterações polimórficas e o comportamento de fusão da fase dispersa dos CLNs regem a forma dos cristais, a morfologia da partícula e o índice de cristalinidade e a temperatura máxima nas quais as nanopartículas lipídicas permanecem sólidas. Geralmente a mistura de lipídeos nas partículas de CLNs mostra um deslocamento para temperaturas mais baixas de ponto de fusão comparadas com o lipídeo sólido, porém os CLNs obtidos ainda permanecem sólidos a temperatura corporal (TAMJIDI et al., 2013).

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X são largamente utilizadas para investigar, principalmente, as alterações polimórficas e comportamento de fusão dos CLNs e dos seus excipientes (JANNIN; MUSAKHANIAN; MARCHAUD, 2008; TAMJIDI et al., 2013). Nanodispersões podem sofrer alterações na estrutura cristalina que pode ser de uma forma amorfa ou outros polimorfos, causados pelo método de obtenção, principalmente homogeneização a alta pressão (LAKSHMI; KUMAR, 2010).

#### **2.4.3 Aplicação de nanopartículas lipídicas no tratamento de leishmanioses**

Carreadores lipídicos coloidais como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) têm sido estudados como sistema de liberação de fármacos principalmente por sua natureza versátil e vantagem na administração de fármacos e compostos ativos com baixa solubilidade aquosa (DATE et al., 2007). Além disso, as nanopartículas lipídicas apresentam biocompatibilidade, por serem obtidas utilizando componentes lipídicos fisiologicamente bem tolerados, biodegradabilidade e podendo ser preparada com características específicas de formulações para aplicação em uma determinada via de administração e/ou doença a ser tratada (DE SOUZA et al., 2018).

Alguns estudos recentes reportaram nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador para fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento de leishmanioses. Jung et al. (2009) desenvolveram NLS contendo anfotericina B apresentando alta eficiência de encapsulação e com uma menor citotoxicidade contra células renais, do que formulações comerciais contendo anfotericina B como Fungizone® and AmBisome®. De modo similar, Gupta et al. (2010) desenvolveram NLS com anfotericina B revestida com um ligante específico do macrófago, e observaram uma maior atividade contra as formas amastigotas da leishmania em relação ao fármaco livre. Além disso, os autores reportaram que as NLS revestidas foram capazes de ser direcionadas para o fígado e baço de camundongos, demonstrando o potencial desses nanocarreadores no tratamento de leishmanioses.

Outro fármaco tradicionalmente utilizado na terepia de leishmaniose, a paromomicina, foi encapsulado em NLS e demonstrou melhoria na eficácia terapêutica e segurança no tratamento de leishmaniose cutânea. Os autores atribuíram esse reultado ao aumento da penetração do fármaco dentro dos macrófagos e sua eficiente internalização pelos macrófagos, quando encapsulados em NLS (HEIDARI-KHARAJI et al., 2016).

As NLS também foram propostas como sistemas carreadores de novas moléculas alternativas aos fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento de leishmanioses. Lopes et al. (2012) desenvolveram nanopartículas lipídicas como sistema carreador de dinitroanilinas para administração parenteral e demonstraram baixa citotoxicidade em células de mamíferos em comparação à molécula livre sugerindo que a encapsulação pode melhorar a tolerabilidade e intervalo terapêutico de dinitroanilinas.

Veerareddy, Vobalaboina e Ali (2009) também propuseram uma nanoesfera lipídica com estearilamina como sistema carreador para a administração parenteral da piperina em camundongos infectados com a *leishmania donovani*. Eles observaram que a piperina encapsulada mostrou uma redução maior de parasitas no fígado e no baço quando comparados com outras formulações.

Marquele-Oliveira et al. (2016) demonstraram que as nanopartículas lipídicas sólidas contendo a fração de lignana lipossolúvel da espécie *Ocotea duckei* Vattimo não foram tóxicas aos macrófagos murinos no intervalo de concentração de 20–80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e exerceu uma proeminente atividade anti-leishmania (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

CLNs têm sido propostos como sistema de liberação para o tratamento de várias doenças negligenciadas, como a malária, chagas, esquistossomose e tuberculose, porém tem sido pouco explorada, em relação às CLNs, no tratamento de leishmanioses (DE SOUZA et al., 2018). Recentemente Monteiro et al. (2017) desenvolveram com sucesso a preparação de CLNs contendo a buparvaquona, um composto utilizado na terapia de leishmanioses, mas que sua baixa solubilidade aquosa, limitava sua aplicação. Sendo assim, o uso de CLNs como sistema de liberação do monoterpene fenólico carvacrol pode ser uma estratégia nanotecnológica promissora para contornar a limitação da sua baixa solubilidade aquosa, possibilitando seu uso na terapia de leishmanioses.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para encapsulamento do carvacrol como uma alternativa nanotecnológica para o tratamento de leishmanioses.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a influência do carvacrol na matriz dos lipídeos sólidos selecionados;
- Desenvolver CLNs inertes e contendo carvacrol;
- Determinar eficiência de encapsulação (EE%) do carvacrol nos CLNs;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* do carvacrol a partir dos CLNs;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* em linhagem celular de monócitos humanos;
- Avaliar a viabilidade *in vitro* sobre formas promastigotas;
- Avaliar a farmacocinética *in vivo* do carvacrol em solução e incorporado aos CLNs.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Avaliação da influência do carvacrol na matriz lipídica

Para a avaliação da influência do carvacrol na matriz lipídica foram utilizados os lipídeos sólidos, ácido esteárico (AE) obtido da Dinâmica<sup>®</sup> (Diadema, SP, Brasil), cera de abelha (CA) e cera de carnaúba (CC) obtidos da GM Ceras (São Paulo, SP, Brasil). As misturas físicas dos lipídeos sólidos e do carvacrol, obtido da Sigma Aldrich<sup>®</sup> (> 98% de pureza) (St. Louis, MO, USA), foram preparadas separadamente, utilizando concentrações percentuais crescentes (10, 25 e 50%) de carvacrol. Primeiramente, as misturas foram submetidas ao aquecimento a uma temperatura acima do ponto de fusão correspondente ao lipídeo sólido. Após a fusão dos lipídeos, a mistura foi submetida à agitação manual por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, as misturas foram resfriadas até a temperatura ambiente (25°C). As misturas lipídicas foram acondicionadas adequadamente e caracterizadas através de DSC, DRX e MLP.

#### 4.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em DSC Q20 TA Instruments (New Castle, EUA), onde as amostras de aproximadamente 3 a 5 mg foram colocadas em porta amostra de alumínio. As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 25 a 100°C, na razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>) (GALVÃO et al., 2016).

#### 4.1.2 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram obtidas em TG Q20 TA Instruments (New Castle, EUA), onde as amostras de aproximadamente 3 a 5 mg foram colocadas em porta amostra de platina. As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 25 a 600°C, na razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>) (GALVÃO et al., 2016).

#### 4.1.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (*Small Angle Scattering* - SAXS) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) na Linha SAXS1 em Campinas/SP, Brasil. Essa linha é equipada com um monocromador de silício (111) produzindo feixe de raios X incidente ( $\lambda = 1,55 \text{ \AA}$ ) colimado e detectado em um Dectris

Pilatus 300k. O intervalo de medida do vetor de espalhamento de 0,1 a 4,0 nm<sup>-1</sup> (FERREIRA et al., 2015).

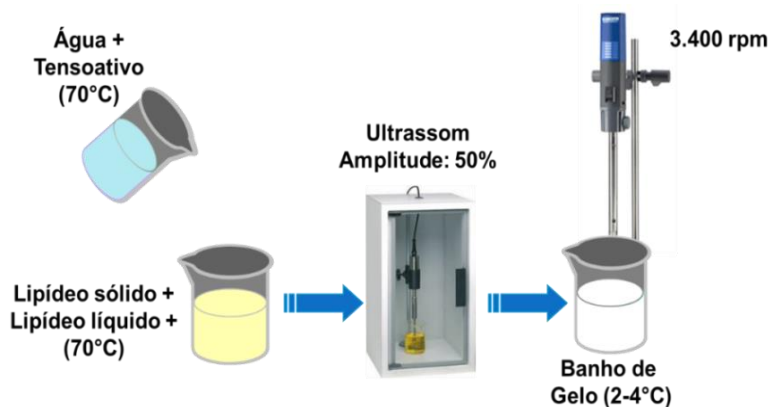
#### 4.1.4 Microscopia de luz polarizada (MLP)

As amostras foram examinadas através de luz polarizada com um microscópio Olympus (Shinjuku, Japan) modelo BX-51 acoplado a uma câmera digital LC Color Evolution (PL-A662). As imagens foram digitalizadas utilizando o programa PixeLINK. As amostras foram aquecidas até o ponto de fusão e depositadas entre duas lâminas de vidro e então observadas no microscópio à temperatura ambiente (25°C) (GAILLARD et al., 2011).

#### 4.2 Preparação dos CLNs

Os CLN foram preparados pelo método de microemulsão O/A a quente adaptado de Souza et al. (2011). Primeiramente a fase oleosa composta da mistura de lipídeo sólido (AE ou CA) e lipídeo líquido (ácido oleico para a CLNs inertes e carvacrol para as CLNs com carvacrol) na razão 7:3 foram aquecidos até 10°C acima do ponto de fusão. A fase aquosa composta do tensoativo Kolliphor 188<sup>®</sup> (ou Poloxamer 188) foi dissolvido em água ultrapura e aquecida até aproximadamente a mesma temperatura (70°C). A fase aquosa aquecida foi vertida sobre a fase oleosa e a dispersão resultante foi submetida a um Ultrassom Sonics (Newtown, EUA) modelo Vibracell<sup>®</sup> 130 W com amplitude de 50% por 10 minutos. A pré-emulsão obtida foi imediatamente dispersa em água resfriada 2 a 4°C (em banho de gelo) na razão de 1:10 seguida por homogeneização a 3400 rpm em Ultra-turrax IKA<sup>®</sup> (Staufen, Germany), Modelo T25 por 3 minutos (Figura 4).

**Figura 4:** Representação esquemática do método de obtenção dos CLNs por microemulsão a quente.



Fonte: Próprio autor.



As dispersões foram liofilizadas em equipamento LS3000 TERRONI<sup>®</sup> para as caracterizações dos CLNs por DSC e DRX.

### 4.3 Planejamento Fatorial

Primeiramente, para a avaliação da influência da matriz lipídica no diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta dos CLNs inertes e contendo carvacrol foi desenvolvido um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. As variáveis analisadas foram o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) requerido pelo lipídeo sólido (CA = 9 ou AE =15) e a concentração de lipídeos (lipídeo sólido + líquido) da pré-emulsão (2% e 5% m/v). Nesse caso, a concentração do tensoativo Kolliphor 188<sup>®</sup> (ou, Poloxamer 188) (1%) foi mantida constante para todas as formulações.

Um segundo planejamento fatorial 2<sup>2</sup> foi desenvolvido para avaliar a influência da concentração de lipídeos e tensoativo no diâmetro médio, índice de polidispersão (PdI) potencial zeta e eficiência de encapsulação (EE%). As variáveis analisadas foram a concentração de lipídeos (2% e 5% m/v) e concentração de tensoativo (1 e 5 % m/v) da pré-emulsão. Nesse caso, o lipídeo sólido utilizado foi a CA.

As formulações foram desenvolvidas de acordo com o planejamento apresentado e os resultados obtidos foram submetidos ao *software* STATISTICA<sup>®</sup> 10.0 (StatSoft Inc<sup>®</sup>, Tulsa-Estados Unidos). Através da análise estatística dos resultados obtidos experimentalmente, foi possível observar os fatores com maior influência sobre as variáveis analisadas.

### 4.3 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV)

#### 4.3.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Young Lin Instrument (Anyang-si, Korea) modelo YL9100, utilizando-se detector ultravioleta (UV/VIS) configurado para o comprimento de onda de 274 nm, baseado na metodologia descrita por Ramos et al. (2002). Para separação cromatográfica foi utilizada uma coluna analítica Agilent<sup>®</sup> (Santa Clara, EUA) Zorbax C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm (5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi composta por acetonitrila: água acidificada com ácido acético a 1% (60:40) sendo bombeada a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> no modo isocrático. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### 4.3.2 Validação do método

Os parâmetros de validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol utilizados foram baseados na Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017). A metodologia foi validada pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, seletividade e robustez. A seletividade do método foi verificada pela avaliação da interferência dos componentes dos CLNs (AE, CA, CC e Kolliphor 188®) na quantificação do carvacrol através da varredura espectrofotométrica na faixa de comprimento de onda de 210 a 450 nm. A sensibilidade do método foi determinada através da medida dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados, matematicamente, a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. Foram determinados de acordo com os modelos matemáticos propostos pela resolução 166/2017 (Equação 1 e 2) (BRASIL, 2017).

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10,0}{IC} \quad (2)$$

Onde:

DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo 3 curvas analíticas;

IC = Inclinação da curva analítica.

A linearidade foi determinada pela obtenção de curva analítica das áreas de pico do carvacrol versus concentrações do padrão de calibração (1, 2, 5, 10, 20 e 40 µg.mL<sup>-1</sup>). A curva analítica e sua respectiva equação da reta foram determinadas através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corrida) em três níveis de concentração (1, 10 e 40 µg.mL<sup>-1</sup>) em triplicata. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) conforme a fórmula “DPR=(DP/CMD)x100, em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. A exatidão foi determinada utilizando os mesmos

níveis de concentração (1, 10 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em triplicata, sendo expressa pela concentração observada dividida pela teórica e multiplicada por 100.

Por fim, a robustez do método de quantificação foi avaliado. A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em resistir a pequenas variações. Um método pode ser considerado robusto quando não é afetado por pequenas modificações em seus parâmetros.

A robustez do método de quantificação do carvacrol foi determinada pela variação de temperatura da coluna cromatográfica (35 e 45°C) e do fabricante do solvente acetonitrila utilizado na fase móvel (J.T.Baker® e Panreac®). A partir da concentração média (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados da avaliação da robustez do método foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de *One-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, com auxílio do software Graph Pad Prism versão 5.0.

#### **4.4 Caracterização dos CLNs**

##### **4.4.1 Diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta**

A determinação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão (IPD) e do potencial zeta das dispersões de CLNs foram realizadas por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments® (Malvern, Reino Unido). As dispersões foram adequadamente diluídas em água Milli-Q® e aproximadamente 1000  $\mu\text{L}$  de amostra foram inseridas em cubeta apropriada para realização das medidas a uma temperatura de 25°C. As medidas foram realizadas com no mínimo 12 leituras e em triplicata para cada amostra após 24h e 1 semana da preparação dos CLNs (RIBEIRO et al., 2016).

##### **4.4.2 Determinação da Eficiência de encapsulação (EE%)**

A eficiência de encapsulação do carvacrol nos CLNs foi determinada através do método indireto descrito por Ribeiro et al. (2016). Inicialmente os CLNs contendo carvacrol foram centrifugadas utilizando uma centrífuga Eppendorf (Hamburg, Alemanha) modelo 5804R em tubos Vivaspin 500 Sartorius® (Göttingen, Alemanha) equipados com ultrafiltros de 10.000 MWCO a uma rotação de 14.000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a quantidade de carvacrol “livre” presente no filtrado, foi quantificada em CLAE através de metodologia previamente validada (Figura 5). A EE% do carvacrol nos CLN foi calculada através da equação 3:

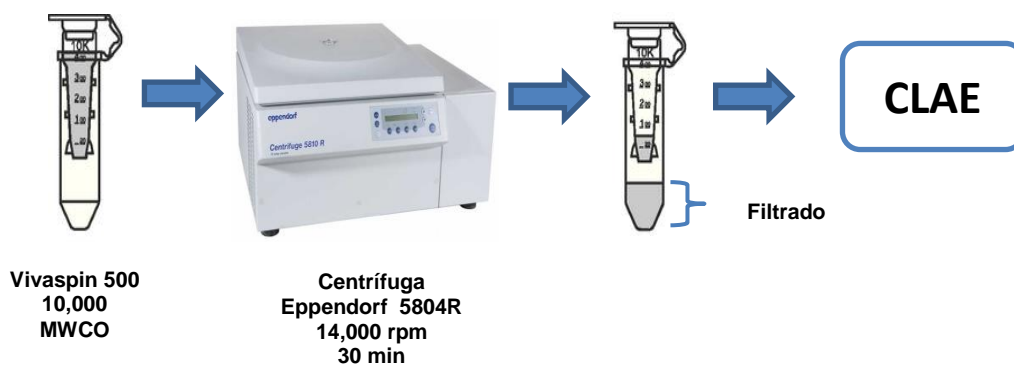
$$EE\% = \frac{(\text{CRV teórico}) - (\text{CRV filtrado})}{(\text{CRV teórico})} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

CRV teórico: Quantidade de carvacrol inicial utilizada na formulação.

CRV filtrado: Quantidade do carvacrol livre no filtrado após a centrifugação.

**Figura 5:** Representação esquemática do método indireto de determinação do carvacrol nos CLNs.



Fonte: Próprio autor

#### 4.4.3 Estabilidade dos CLNs

As dispersões de CLNs inertes e contendo carvacrol foram mantidas a temperatura de 25°C e 4°C e a sua estabilidade avaliada pela medida do diâmetro médio de partícula, IPD e potencial zeta através das metodologias descritas nos tópicos anteriores. Os resultados foram registrados por até 90 dias após a preparação.

#### 4.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC dos CLNs foram obtidas em equipamento DSC NETZSCH modelo DSC 200 F3 (Selb, Germany), onde as amostras de aproximadamente 3 - 5 mg foram colocadas em porta amostra de alumínio. As análises foram realizadas na faixa de 25 a 300°C, na razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>).

#### 4.4.5 Difração de raios-X

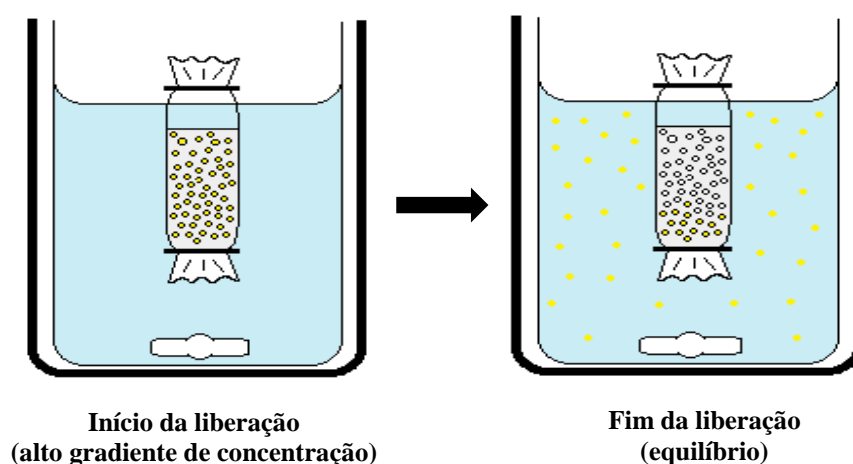
A difratometria de raios-X foi realizada em equipamento Bruker (Billerica, EUA) modelo D8 Advance; Radiação: Cu K<sub>α</sub> (λ = 1,594 Å); variando o ângulo em uma faixa de 2° a

40° a uma velocidade de  $1^\circ \text{ min}^{-1}$  em passos de 0,020, com voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA.

#### 4.5 Estudo da cinética de liberação *in vitro* do carvacrol a partir dos CLNs

O estudo da cinética de liberação do carvacrol foi realizado através da metodologia de diálise reportada por Fangueiro et al. (2016), adaptada. Inicialmente as membranas acetato de celulose com 10.000 MWCO Fisher Scientific® (Whaltam, EUA) foram preparadas segundo instruções recomendadas do fabricante. O meio de liberação foi preparado utilizando uma mistura de tampão fosfato salina (pH 7,4) e álcool etílico absoluto (99,8%) na proporção 7:3 (v/v). A solução de carvacrol foi preparada utilizando o meio de liberação. Em seguida, 2 mL da dispersão de CLNs contendo carvacrol que apresentou uma maior EE%, e da solução de carvacrol foram colocadas separadamente em sacos de diálise e suspensos em um recipiente contendo 10 mL do meio de liberação, como representado na Figura 6. O sistema foi mantido em banho maria a  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  sob agitação magnética por 24 horas. 300  $\mu\text{L}$  de amostra foi coletado após 0,25; 0,5; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 e 24 horas do início do experimento, sendo substituídas pela mesma quantidade retirada de meio, para que se mantivessem com volume inicial do meio de liberação.

**Figura 6:** Representação esquemática do experimento de cinética de liberação *in vitro* do carvacrol a partir dos CLNs.



Fonte: Próprio autor.

As amostras coletadas foram analisadas utilizando a metodologia de quantificação em CLAE previamente validada. Os dados de liberação do carvacrol foram avaliados quanto a diferentes modelos cinéticos, incluindo, modelo de ordem zero e de primeira ordem,

Korsmeyer & Peppas e Weibull através do software KinetDS Copyright (C) 2010 Aleksander Mendyk. O experimento foi realizado em sextuplicata.

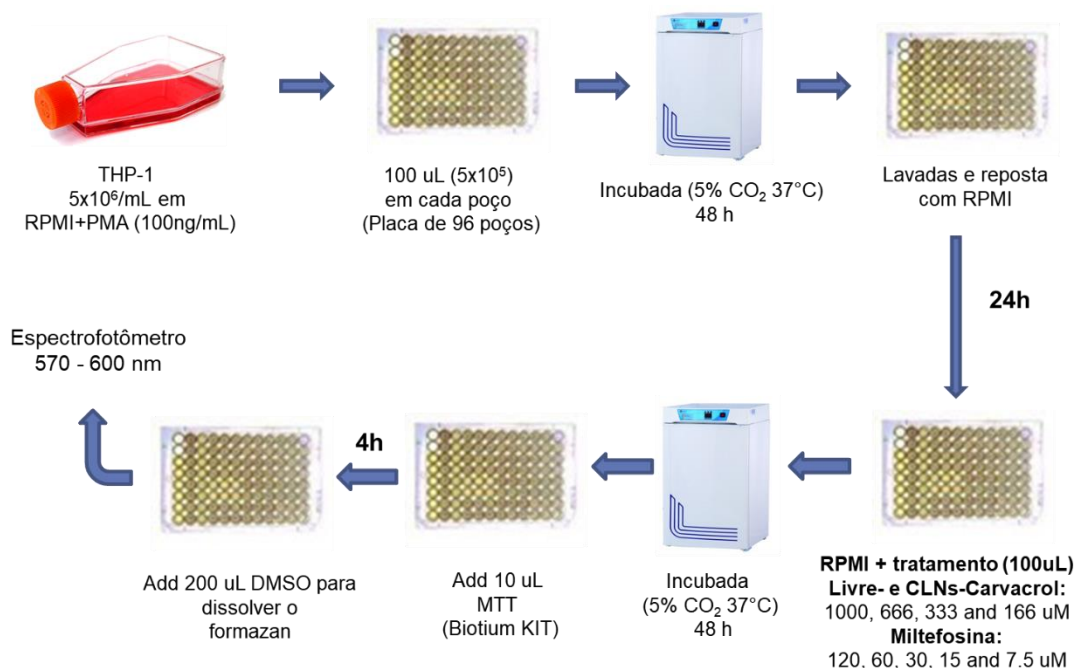
#### 4.6 Citotoxicidade *in vitro* em células THP-1 diferenciadas

As células THP-1 (linhagem celular de monócitos humanos - ATCC) foram cultivadas em meio RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM de HEPES em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C com passagens a cada 2 ou 3 dias. Para a diferenciação das mesmas em macrófagos aderentes, a cultura foi ajustada para uma densidade de 5 x 10<sup>6</sup>/mL e foram adicionados 100 ng/mL de acetato miristato de forbol (phorbol myristate acetate- PMA). Em seguida, 5 x 10<sup>5</sup> células foram transferidas para cada poço de uma placa de 96 poços e foram incubadas por 48h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de diferenciação, as células foram lavadas e o meio contendo PMA foi substituído por RPMI completo livre de PMA. Após 24h, as células THP-1 diferenciadas foram incubadas com concentrações crescentes de carvacrol, CLNs c/CRV (166 - 1000 µM) e miltefosina – controle (7.5 – 120 µM) em meio RPMI por 48h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Após o tempo de incubação, as células foram expostas a 10 µL/poço de MTT (*Biotium kit*) por 4h a 37°C. O MTT é convertido, por células viáveis, em um produto escuro insolúvel em água, o formazan, e, portanto, 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilização do formazan. O procedimento experimental está representado na Figura 7 e foi adaptado da metodologia descrita por Petri e Silva et al. (2016). As absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, e utilizadas para o cálculo da viabilidade celular (%), com base na equação 4:

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \frac{\text{Abs (tratamento)} - \text{Abs (DMSO)}}{\text{Abs (controle negativo)} - \text{Abs (DMSO)}} \times 100 \quad (4)$$

Os valores de concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) foram obtidos pela regressão não linear da curva sigmoidal do crescimento utilizando o *software Graph Pad Prism 5.0*.

**Figura 7:** Representação esquemática do procedimento experimental da citotoxicidade *in vitro* em células THP-1 diferenciadas após tratamento com carvacrol-livre, CLNs com carvacrol e miltefosina.



Fonte: Próprio autor

#### 4.7 Cultura de *Leishmania*

Os isolados de promastigotas de *L. amazonensis* da cepa RAT/BA/74/LV78 foram originalmente fornecidos pelo Dr. Lynn Soong (UTMB, Texas) e mantidas em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro bovino fetal 10% e gentamicina (10 µg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 24°C. A curva de crescimento parasitária foi obtida a partir da contagem diária de parasitas em cultura durante sete dias. Os promastigotas em fase exponencial de crescimento foram utilizadas para os ensaios de atividade leishmanicida do carvacrol puro e CLNs contendo carvacrol.

#### 4.8 Viabilidade *in vitro* sobre formas promastigotas

As formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase de crescimento exponencial foram utilizadas para os experimentos. As promastigotas foram contadas em hemocítômetro, ajustando-se a concentração dos parasitos para 5x10<sup>6</sup> promastigotas/mL com meio Schneider suplementado. As amostras de carvacrol puro, CLNs contendo carvacrol foram analisados em triplicata e utilizado como controle positivo a Miltefosina. Como controle negativo, as culturas passaram por todos os procedimentos, porém, foram mantidas em meio Schneider sem adição do tratamento.

As avaliações foram realizadas em microplacas contendo 96 poços, sendo em cada um adicionadas os tratamentos (10 µL), diluídos em meio Schneider e 90µL da cultura de promastigotas. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 24°C por 48h horas.

Durante o período de incubação, as placas foram inspecionadas sob microscópio invertido e ao final foram adicionados a cada poço 10µL de solução de resazurina (TOX-8 *In vitro Toxicology Assay Kit Resazurin Based*, Sigma). Em seguida as placas foram incubadas a 34°C e, após um período de 2-3 horas as absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas nos comprimentos de onda 570 e 600nm. O experimento foi adaptado da metodologia descrita por Craig et al. (2017). As absorbâncias obtidas pela leitura das placas foram utilizadas para o cálculo da viabilidade celular dos tratamentos com base na equação 5:

$$\% \text{ de Viabilidade} = \frac{(\text{Abs } 570 \text{ nm} - (\text{Abs } 600\text{nm} \times \text{RO})_{\text{teste}})}{(\text{Abs } 570 \text{ nm} - (\text{Abs } 600\text{nm} \times \text{RO})_{\text{controle}})} \times 100 \quad (5)$$

Os valores de CI<sub>50</sub> foram obtidos pela regressão não linear da curva sigmoidal de inibição do crescimento *software Graph Pad Prism 5.0*.

#### **4.9 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE/FLD)**

##### **4.9.1 Instrumentação e condições cromatográficas**

As análises foram realizadas em equipamento Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) equipado com coluna de Agilent® Zorbax C18 de fase reversa de 150 x 4.6 mm e tamanho de partícula 5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). A fase móvel utilizada foi composta por ACN:água acidificada (1% de ácido acético) 75:25 sendo bombeada a um fluxo de 0.6 mL.min<sup>-1</sup> a 35°C. O detector de fluorescência utilizado foi o Agilent FLD 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) operando em comprimentos de onda de emissão e excitação de 278 e 315 nm, respectivamente. O volume de injeção utilizado foi 30 µL (VIÑAS, SOLER-ROMERA & HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 2006) Adaptado.

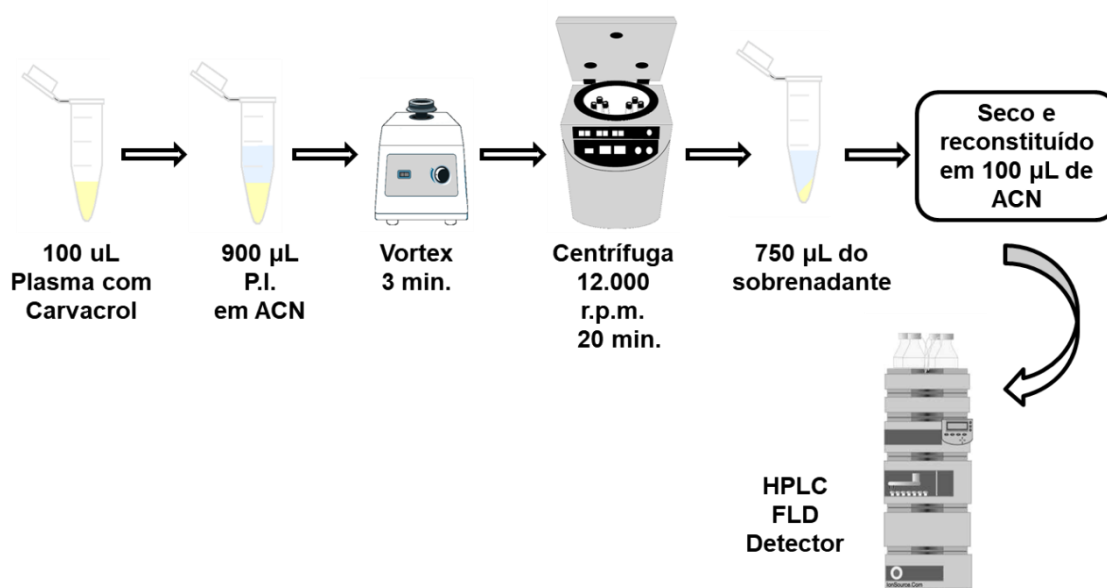
##### **4.9.2 Preparação das amostras e método de extração**

O método de extração utilizado foi o método de precipitação de proteínas seguido de secagem (DE SMET et al., 2009). Para 100 µL de plasma de rato (Innovative Research, Inc.,



(Novi, MI), 900  $\mu\text{L}$  de solução do padrão interno o-cresol (3000  $\text{ng/mL}$ ) em acetonitrila, foi utilizada para precipitação das proteínas plasmáticas. A mistura foi submetida ao vórtex por 3 minutos e centrifugada a 12.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 20 minutos. O sobrenadante (750  $\mu\text{L}$ ) foi seco e reconstituído em 100  $\mu\text{L}$  de ACN e injetado em CLAE-FLD nas condições previamente descritas (Figura 8).

**Figura 8:** Representação esquemática do método de extração do carvacrol a partir do plasma de rato (método de precipitação de proteínas seguido de secagem).



Fonte: Próprio autor

#### 4.9.3 Validação do método

O método foi validado de acordo com o guia de validação de métodos bioanalíticos do *Food and Drugs Administration* (FDA). A seletividade do método foi avaliada através da observação da presença de possíveis picos de interferentes presentes no plasma de rato (branco). A presença de picos de interferentes com o mesmo tempo de retenção (TR) do analito e do padrão interno foi verificado. A sensibilidade do método foi determinada através da medida do limite de quantificação (*lower limit of quantification* – LLOQ) do carvacrol. O LLOQ foi determinado como a menor concentração utilizada de carvacrol na curva de calibração com precisão e exatidão de  $100 \pm 20\%$ . A linearidade foi determinada pela plotagem da razão das áreas de pico do carvacrol e padrão interno versus concentrações do padrão de calibração ( $50,06 - 5000 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Todas as curvas de calibração devem apresentar coeficiente de correlação ( $r^2$ )  $\geq 0.99$ . A precisão e exatidão do método foram determinadas

pela análise das amostras de controle de qualidade “*QC samples*” (84,13; 1080 e 2800 ng.mL<sup>-1</sup>) em pentuplicata em três dias diferentes. A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação CV (%) inter- e intra-dia e a exatidão pela avaliação da concentração observada pela teórica multiplicada por 100.

A recuperação do analito a partir do plasma foi determinada nos três níveis de *QC* através da comparação da área do pico de carvacrol depois da extração e do carvacrol em solução (“*unextracted*”) contendo as mesmas concentrações em ACN (n=3). A estabilidade do carvacrol em amostra de plasma foi determinada em dois níveis de concentração das “*QC samples*” (84,13 e 2800 ng.mL<sup>-1</sup>) nas possíveis condições de manipulação de amostra e análise. As amostras de plasma contendo carvacrol foram expostas a diferentes condições de temperatura: temperatura ambiente, -80°C e até três ciclos gela-degela (as amostras foram congeladas a -80°C e então descongeladas até a temperatura ambiente, após a repetição desse processo três vezes, as amostras foram submetidas ao processo de extração e analisadas). Para determinação da estabilidade das amostras após processamento, estas foram mantidas no auto-injetor do CLAE-FLD a temperatura ambiente por 24h e então analisadas.

#### **4.10 Avaliação da farmacocinética *in vivo***

##### **4.10.1 Animais**

Ratos Wistar saudáveis do sexo masculino canulados na veia jugular (peso 300 a 350g) foram obtidos do fornecedor *Charles River Laboratories*. Esse estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética local “*Institutional Animal Care and Use Committee*” da *University of Florida* (Gainesville, FL) sob número de protocolo #201710000. O protocolo foi realizado de acordo com “*Principles of Laboratory Animal Care*” (publicação da NIH #85-23, revisada 1985). Os ratos foram alimentados com ração granulada padrão e mantidos em condições de laboratório padronizadas com um ciclo escuro/claro de 12h. Todos os animais foram alimentados durante a noite anterior aos experimentos e com acesso a água *ad libitum*.

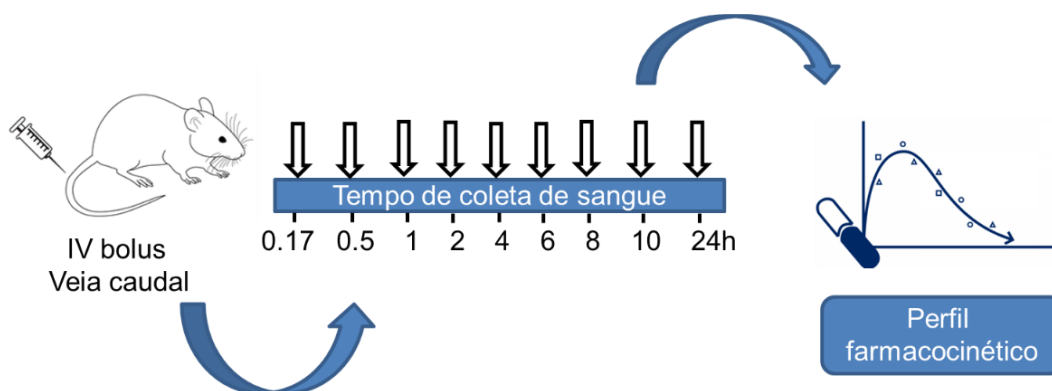
##### **4.10.2 Farmacocinética *in vivo***

A avaliação farmacocinética do carvacrol em plasma de rato foi realizada através da administração intravenosa (IV) em bolus de 3 mg/kg de carvacrol-livre (em solução de DMSO) e encapsulado, CLNs contendo carvacrol.

No dia do experimento 3 mg/kg do carvacrol-livre (em solução) e encapsulado, CLNs contendo carvacrol foram administrados através da veia caudal lateral (*lateral tail vein*) em

bolus. Nove amostras de sangue (300  $\mu$ L) foram coletadas através da cânula na veia jugular, e armazenadas em tubos contendo EDTA nos tempos 0,17; 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24h após a administração (Figura 9). As amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O plasma foi imediatamente separado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise (CHOOLUCK, et al., 2012) Adaptado.

**Figura 9:** Procedimento experimental utilizado na avaliação farmacocinética *in vivo* do carvacrol-livre (em solução) e encapsulado, CLNs c/ carvacrol.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.10.3 Análise dos dados farmacocinéticos

A análise não-compartimental dos dados obtidos foi realizada através do software Phoenix 8.0 (Certara, Princeton, NJ). Todos os parâmetros farmacocinéticos descritos a seguir foram calculados para cada animal e a média e desvio padrão (DP) de cada parâmetro foram determinados. A razão da constante de eliminação ( $k_e$ ) foi estimada pela inclinação (slope) da fase de eliminação exponencial terminal obtida através do perfil do gráfico do logaritmo da concentração plasmática pelo tempo, utilizando ao menos 3 pontos. O tempo da meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) foi calculada como  $\ln(2)/k_e$ . A área sobre a curva (AUC) da curva de concentração pelo tempo foi calculada pela regra do trapézio log-linear. O clearance (CL) foi calculado como a dose dividido pela  $\text{AUC}_{0-\infty}$ . O volume de distribuição ( $V_{\text{dss}}$ ) foi calculado como o CL dividido pela  $k_e$ . O tempo de residência médio, o “*mean residence time*” (MRT) foi calculado como a área sobre o primeiro momento da curva ( $\text{AUMC}_{0-\infty}$ )/ $\text{AUC}_{0-\infty}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da influência do carvacrol na matriz lipídica

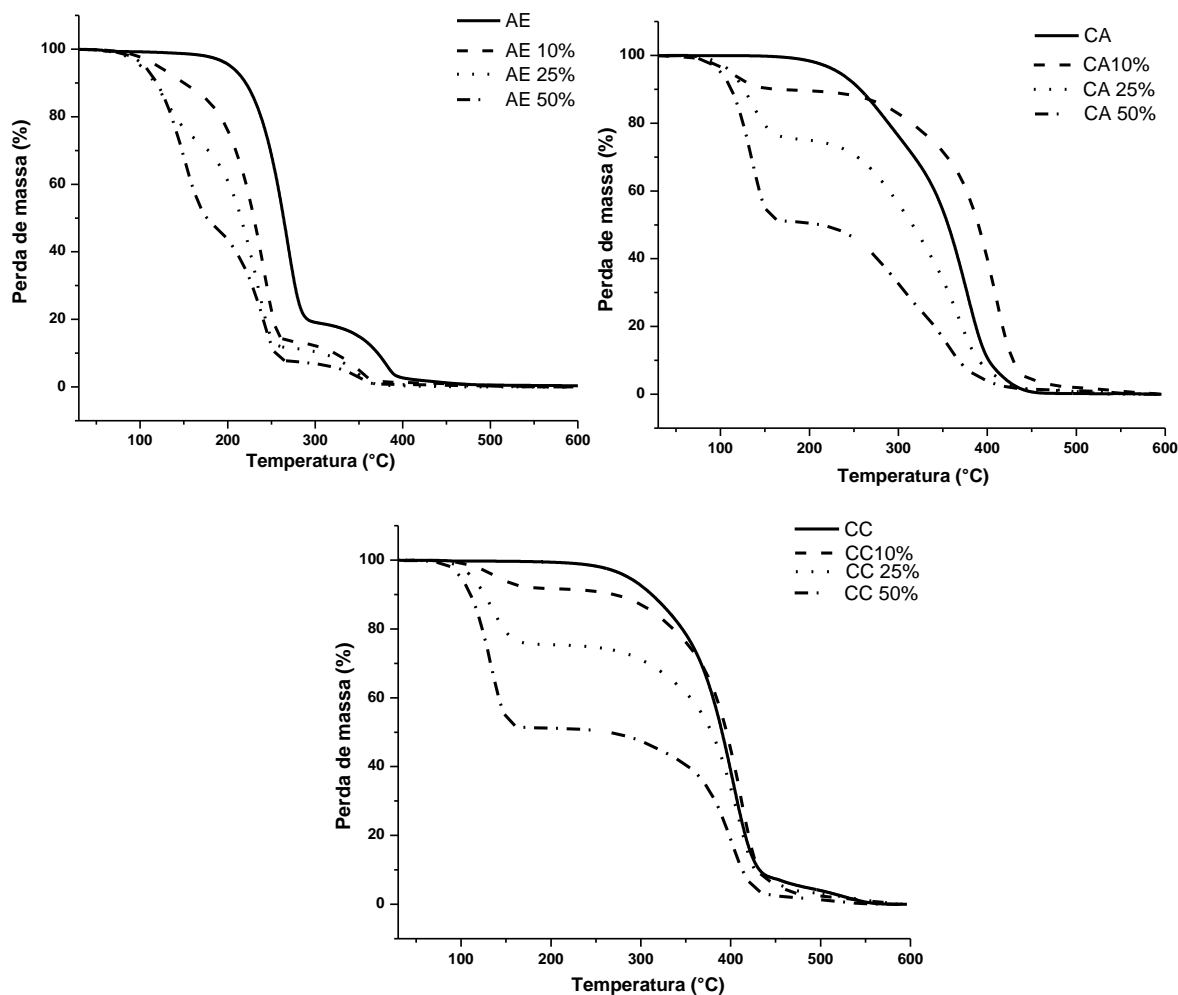
#### 5.1.1 Termogravimetria (TG)

A avaliação das matrizes lipídicas é uma etapa essencial no desenvolvimento de formulações de CLNs, pois é desejável que a matriz lipídica se mantenha sólida a temperatura ambiente e corporal. Além disso, é possível prever possíveis modificações durante o processo de recristalização que ocorre na preparação dos CLNs, e também a miscibilidade entre o lipídeo sólido e o líquido (KASONGO et al., 2011; ATTAMA et al., 2006).

Em geral, a encapsulação de óleos essenciais e seus compostos ativos em sistemas nanométricos representam um desafio. Isso porque, na maioria dos métodos de preparação de sistemas nanoestruturados necessitam de uma ou mais etapas como, aquecimento, evaporação do solvente e homogeneização a alta pressão, nas quais os componentes dos óleos essenciais são submetidos a condições que podem levar a degradação e/ou perda do composto ativo por volatilização (DE MATOS; LUCCA, KOESTER, 2019). Sendo assim, a termogravimetria (TG) pode ser útil na determinação da alteração da perda de massa do carvacrol após o processo de recristalização (temperagem). A Figura 10 representa a variação de massa em função da temperatura dos lipídeos sólidos, ácido esteárico, cera de abelha, cera de carnaúba (respectivamente) e suas misturas físicas com concentrações crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%).

Na Figura 10 é possível observar a curva TG do ácido esteárico, o qual apresentou duas perdas de massa, a primeira no intervalo de temperatura de 161 – 306°C ( $\Delta m_1 = 79,63\%$   $T_{pico\ DTG} \sim 267^\circ C$ ) característica de decomposição do AE e a segunda no intervalo de 306 - 410°C ( $\Delta m_2 = 16,56\%$   $T_{pico\ DTG} \sim 380^\circ C$ ) característica de eliminação de materiais carbonáceos do AE (CHEN et al., 2013; ROWE et al., 2009). Também é possível observar a curva TG da cera de abelha, a qual apresentou apenas uma perda de massa no intervalo de temperatura de 180 – 480°C ( $\Delta m_1 = 99,5\%$   $T_{pico\ DTG} \sim 396,7^\circ C$ ), e da cera de carnaúba, que também apresentou apenas uma perda de massa na faixa de temperatura de 250 – 500°C ( $\Delta m_1 = 98,5\%$   $T_{pico\ DTG} \sim 426,1^\circ C$ ) respectivamente.

**Figura 10:** Curva de TG do ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 25% (AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente.



As misturas físicas de AE, CA e CC com quantidades crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%) também foram avaliadas por TG. Foi possível observar que mesmo após o aquecimento por 5 minutos na preparação das misturas físicas, o carvacrol foi detectado na primeira perda de massa da curva TG praticamente com a mesma porcentagem em que as misturas foram preparadas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados da 1ª perda de massa ( $\Delta m$ ) referente às curvas TG das misturas físicas dos lipídeos sólidos (AE, CA e CC) com concentrações crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%).

Amostra	1ª perda de massa
	$\Delta m$ (%)
AE 10%	10,40
AE 25%	24,44
AE 50%	49,48
CA 10%	9,66
CA 25%	23,74
CA 50%	47,84
CC 10%	7,82
CC 25%	24,20
CC 50%	48,07

É importante destacar, que mesmo o carvacrol sendo considerado um monoterpreno volátil (HIGUERAS et al., 2015), é possível observar (Figura 10) que ao adicionar o carvacrol aos lipídeos sólidos nas três proporções estudadas, não foi possível detectar perda de massa até a temperatura de 100°C, e, portanto o mesmo poderá ser utilizado para obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados, já que os métodos de preparação desse sistema geralmente não requerem temperaturas acima de 100°C (MEHNERT; MÄDER, 2012).

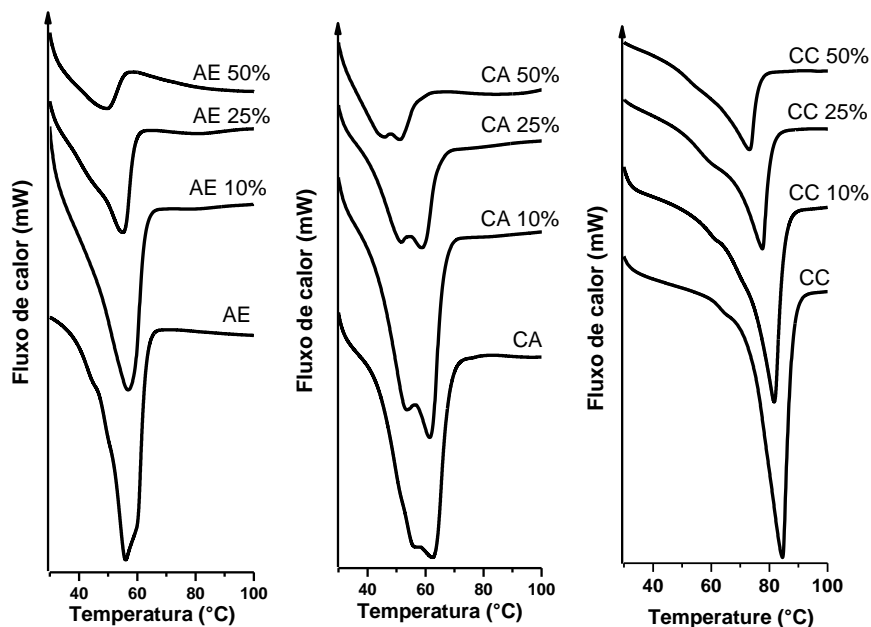
### 5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

DSC é uma técnica de grande importância para caracterização de CLNs, fornecendo informações relacionadas ao estado físico e grau de cristalinidade da amostra, através do comportamento térmico (SOUZA, 2011).

A Figura 11 apresenta as curvas DSC dos lipídeos sólidos, ácido esteárico, cera de abelha, cera de carnaúba (respectivamente) e suas misturas físicas com concentrações crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%).

Na Figura 11 é possível observar a curva DSC do ácido esteárico, um pico endotérmico na faixa de temperatura entre 40 e 65°C ( $T_{\text{pico}} \sim 57^\circ\text{C}$ ), o qual está relacionado ao seu ponto de fusão (CHEN et al., 2013; ROWE et al., 2009). Nas Figuras 14 e 15 também é possível observar a presença de pico endotérmico característico de fusão da cera de abelha ( $T_{\text{pico}} \sim 63^\circ\text{C}$ ), e de carnaúba ( $T_{\text{pico}} \sim 82^\circ\text{C}$ ), respectivamente.

**Figura 11:** Curva DSC do ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 25% (AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente.



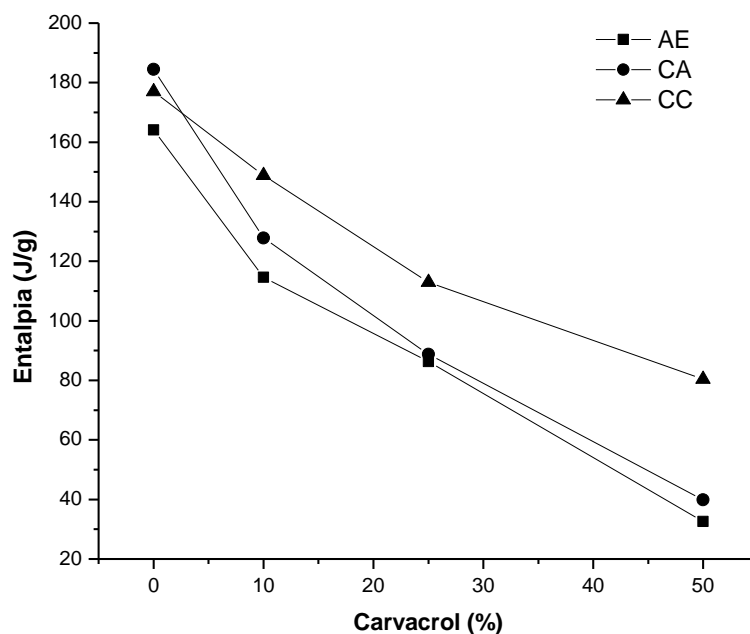
Também na Figura 11 é possível observar que após a adição de concentrações crescentes de carvacrol (10, 25%, 50%), houve um pequeno deslocamento do ponto de fusão para temperaturas menores após a adição de 25 e 50% (54,9; 50,2 °C, respectivamente) em relação ao ácido esteárico puro. Porém após a adição de 10% não houve alteração do ponto de fusão (57°C). O mesmo foi observado para as ceras de abelha e carnaúba as quais apresentaram um pequeno deslocamento no ponto de fusão para menores temperaturas após a adição de 25 e 50% de carvacrol (CA: 58,5 e 50,9°C e CC: 77,3 e 72,9°C, respectivamente).

Outro parâmetro importante a ser considerado em análises de DSC é a entalpia, ou seja, a quantidade de calor envolvida nos eventos térmicos (GIOLITO e IONASCHIRO, 1980). Nas Figuras 11 e 12 podemos observar que após o aumento do teor de carvacrol (10, 25 e 50%) houve uma diminuição nos picos endotérmicos e consequentemente na entalpia relacionada ao evento endotérmico de fusão das misturas em relação aos lipídeos sólidos puros. Severino et al. (2011) reportaram em seu estudo com matrizes lipídicas de ácido esteárico e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico, que o aumento da entalpia de fusão e cristalização é inversamente proporcional a quantidade de lipídeo líquido na matriz. Eles observaram que, após a adição dos triglicerídeos (lipídeo líquido) ao ácido esteárico, houve uma diminuição na entalpia e cristalinidade, o que indica o alto grau de desordem da matriz lipídica. Resultados similares foram encontrados no presente estudo após a adição de

carvacrol (10, 25 e 50%) aos lipídeos sólidos (AE, CA e CC), promovendo uma desordem na matriz lipídica. Essas observações sugerem que o carvacrol nas concentrações utilizadas nas misturas físicas promoveu uma desordem na matriz lipídica (ATTAMA; SCHICKE; MÜLLER-GOYMANN, 2006). Provavelmente a presença do carvacrol impediu o completo rearranjo dos lipídeos sólidos em questão (VILLALOBOS-HERNANDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2005).

Além disso, a miscibilidade entre os lipídeos sólidos estudados e o carvacrol foi avaliado por DSC. Uma diminuição no ponto de fusão dos lipídeos sólidos foi detectada após a incorporação do carvacrol na estrutura dos lipídeos sólidos. A diminuição no  $T_{\text{pico}}$ ,  $T_{\text{onset}}$ , entalpia e aumento da faixa de temperatura do evento de fusão (*width of the melting event-WME*) referente ao AE, CA e CC, quando 10, 25% e 50% do carvacrol foi adicionado, demonstrando a miscibilidade entre eles nessa faixa de concentração (Tabela 2). Resultados similares foram encontrados por Kasongo et al. (2011) quando o Transcutol® HP na concentração até 20% (p/p) foi adicionado ao lipídeo sólido Precirol® ATO 5.

**Figura 12:** Entalpia em função da concentração de carvacrol em cada lipídeo sólido, ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC).





**Tabela 2:** Dados de DSC relacionados a misturas binárias do carvacrol e os lipídeos sólidos (AE, CA e CC).

<b>Amostras</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>pico</sub> (°C)</b>	<b>WME<sup>1</sup> (°C)</b>
AE	37,0	57,0	28,0
AE 10%	36,0	56,5	29,0
AE 25%	34,3	54,9	30,0
AE 50%	34,0	50,2	30,0
CA	55,8	63,0	32,6
CA 10%	50,0	61,4	32,7
CA 25%	48,1	58,5	32,7
CA 50%	48,0	50,9	24,5
CC	39,5	82,0	35,5
CC 10%	38,6	81,4	36,5
CC 25%	38,2	77,3	37,1
CC 50%	36,2	72,9	39,2

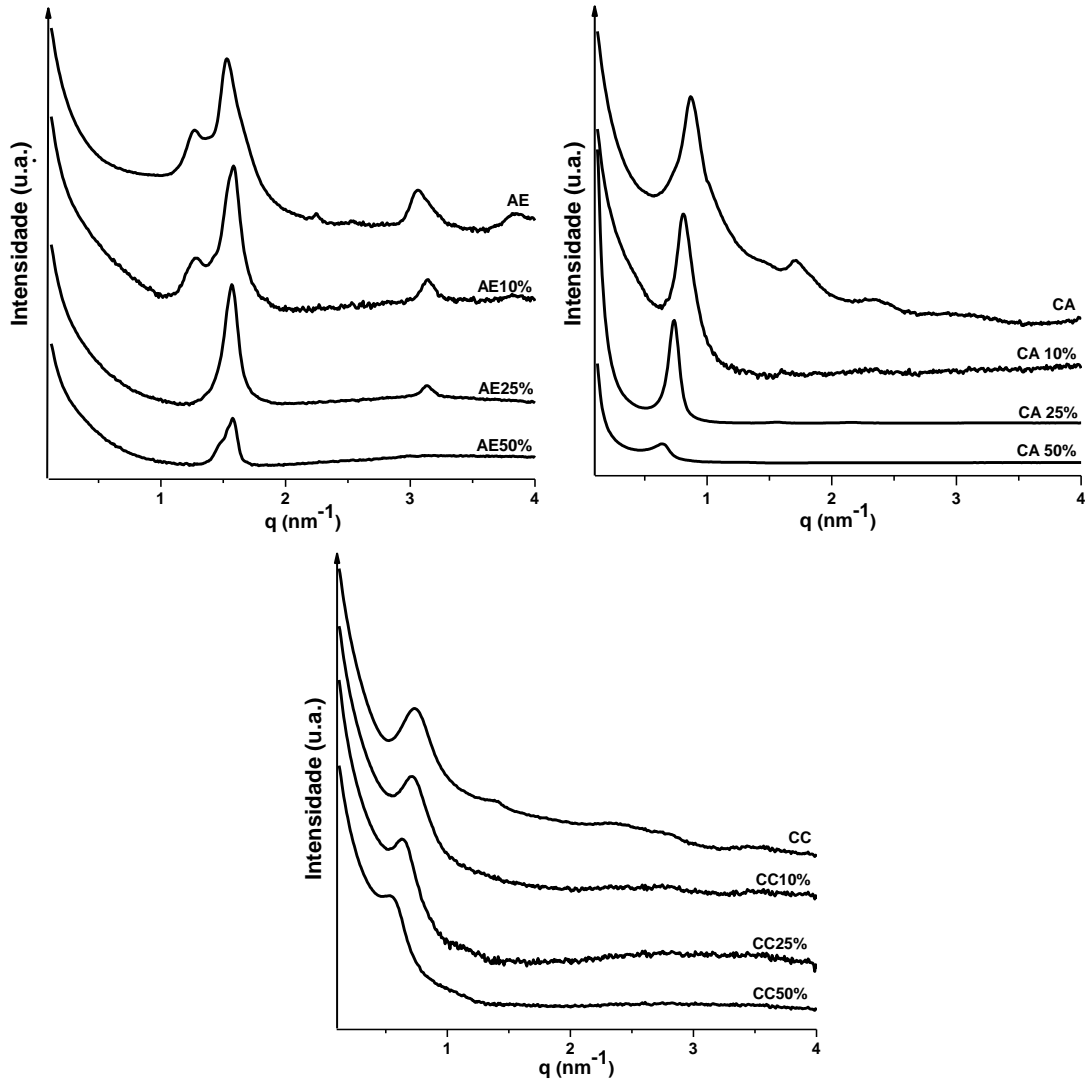
<sup>1</sup> Faixa do pico do ponto de fusão (Width of the melting point – WME)

### 5.1.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A Figura 13 apresenta as curvas de SAXS relacionadas a cada lipídeo sólido e suas misturas com concentrações crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%), fornecendo informações sobre estruturação dos cristais e a forma que eles se organizam.

Em relação ao ácido esteárico puro é possível observar a presença de 5 picos em  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ) de 1,27; 1,53; 2,25; 3,06; 3,84; característico de material altamente estruturado (Figura 13). Por sua vez as ceras de abelha e de carnaúba (Figura 13) apresentaram picos com periodicidade típica de estrutura lamelar (1:2:3:4...) (MARTINS et al., 2016). Attama et al. (2006) também reportaram que a cera de abelha apresenta peridiocidade típica de estrutura lamelar. Com o aumento a concentração de carvacrol, alguns picos característicos dos respectivos lipídeos sólidos desapareceram e/ou teve sua intensidade diminuída, o que sugere que o carvacrol diminuiu a estruturação dos lipídeos sólidos, confirmando os resultados de DSC (GALVÃO et al., 2016).

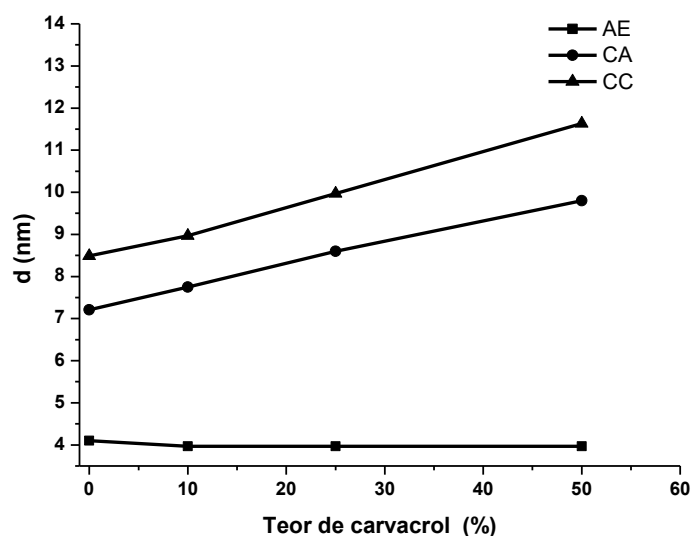
**Figura 13:** Padrão de intensidade de espalhamento  $I(q)$  em função do vetor de espalhamento ( $q$ ) para o ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 2525% (AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente.



A Figura 14 apresenta o espaçamento entre planos cristalinos ( $d$ ) em função do teor de carvacrol (ALEXANDRIDIS; OLSSON; LINDMAN, 1998). Esse parâmetro pode ser calculado através das curvas obtidas pela equação 6:

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (6)$$

**Figura 14:** Parâmetro estrutural característico (espaçamento entre planos cristalinos,  $d$ ) dos lipídeos sólidos (AE, CA e CC) em função do teor de carvacrol (10, 25% e 50%).



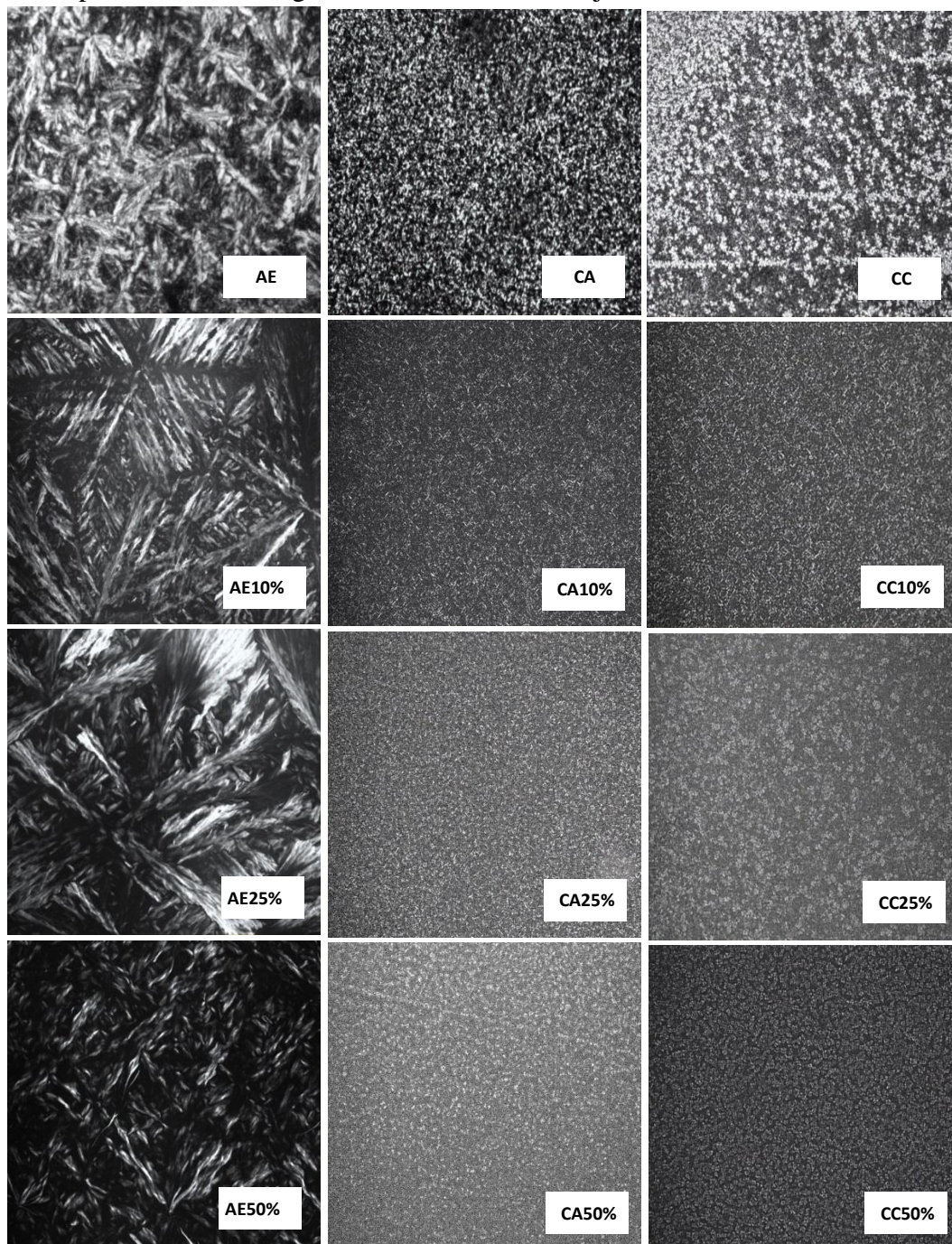
É possível observar que com o aumento do teor de carvacrol o ácido esteárico não teve o seu espaçamento entre planos cristalinos ( $d \sim 4$  nm) modificado. Já as ceras, tanto a de abelha como a de carnaúba, apresentaram um aumento crescente do “ $d$ ” em função do aumento do teor de carvacrol. De acordo com Alexandridis, Olsson e Lindman (1998), a medida que o valor de “ $d$ ” aumenta, a quantidade de interfaces (e lamelas) diminui e portanto o espaço entre as lamelas aumenta. Isso indica que o carvacrol está entre as lamelas dos lipídeos sólidos o que promove um aumento no valor de “ $d$ ” e uma menor estruturação, confirmando os dados obtidos por DSC.

#### 5.1.4 Microscopia de Luz Polarizada

A Microscopia de Luz Polarizada é uma técnica utilizada para avaliar o comportamento ótico dos sistemas. De acordo com o efeito que causa sob um plano de luz polarizada uma substância pode ser classificada como anisotrópica ou isotrópica (CHORILLI et al, 2009). Na caracterização de lipídeos é utilizada para observar modificações microestruturais do cristal (ATTAMA; SCHICKE; MÜLLER-GOYMANN, 2006).

A Figura 15 apresenta os lipídeos sólidos (AE, CA e CC) e suas respectivas misturas físicas com concentrações crescentes de carvacrol. É possível observar que os lipídeos sólidos puros apresentaram microestrutura cristalina altamente ordenada, assim como foi observado nas caracterizações anteriores. O AE exibiu uma estrutura em forma de “agulha” (*needle-shaped structure*) e as ceras, CA e CC apresentaram cruzes de malta, característico de estrutura lamelar, confirmando os dados obtidos por SAXS (GALVÃO et al., 2016).

**Figura 15:** Fotomicrografia ótica obtida através de MLP à temperatura ambiente correspondente ao ácido esteárico (AE), cera de abelha (CA), cera de carnaúba e suas misturas físicas contendo concentrações crescentes de carvacrol: 10% (AE 10%, CA10% e CC10%), 25% (A AE 25%, CA25%, CC25%) e 50% (AE50%, CA50% e CC50%), respectivamente. Imagens obtidas utilizando objetiva com aumento de 10X.



Ao adicionar concentrações crescentes de carvacrol (10, 25 e 50%) é possível observar que ocorre uma diminuição em tamanho das microestruturas em relação aos lipídeos sólidos puros (AE, CA e CC), sugerindo uma diminuição na estruturação e cristalinidade, como observado nas caracterizações anteriores (DSC e SAXS). Esses resultados estão de acordo

com Gaillard et al. (2011) em que as fotomicrografias óticas demonstraram que a cristalinidade da cera de abelha diminuiu com o aumento da concentração de resina colófia.

### **5.5 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol por CLAE-UV**

A determinação quantitativa de fármacos exige o uso de procedimentos analíticos válidos a fim de que os resultados gerados estejam reprodutíveis e confiáveis. Assim, depois de estabelecidas as condições cromatográficas para a quantificação do carvacrol, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, o método desenvolvido foi validado com base na Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limite de detecção e quantificação.

#### **5.5.1 Seletividade**

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja originário exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra.

Para isso, foi realizada uma varredura espectrofotométrica dos componentes lipídicos (ácido esteárico, cera de abelha, cera de carnaúba) e do tensoativo Kolliphor<sup>®</sup> P18 presentes na formulação, a fim de avaliar a possível interferência destes na quantificação do carvacrol. As respectivas varreduras espectrofotométricas estão representadas no Apêndice A.

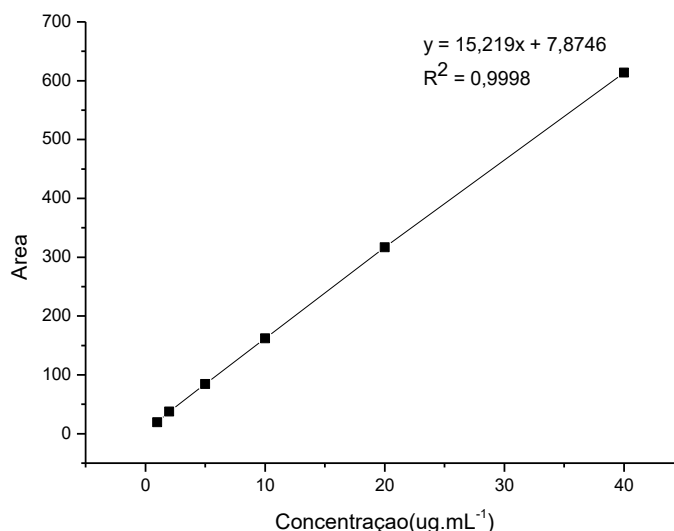
De acordo com os resultados obtidos na avaliação das amostras foi possível observar que os componentes da formulação não interferem na quantificação do carvacrol, pois não absorvem no comprimento de onda do mesmo, demonstrando que o método de quantificação é seletivo.

#### **5.6.2 Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade metodológica em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2017). Esta foi verificada pela curva analítica

preparada conforme descrita no item 4.4.3. A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das amostras em concentrações crescentes de carvacrol de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na região do ultravioleta a 274 nm estão representados na Figura 16.

**Figura 16:** Representação gráfica da curva analítica do carvacrol através do método de quantificação no CLAE-UV em um comprimento de onda de 274 nm.



A equação da reta, determinada através do método dos mínimos quadrados, foi:  $y = 15,219x + 7,8746$ , onde “x” é a concentração em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e “y” a área, obtidos por CLAE, apresentando um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) igual a 0,9998. Este coeficiente é um parâmetro que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois valores superiores a 0,99 indicam a existência de uma resposta linear na faixa de concentração trabalhada (BRASIL, 2017).

Assim, os resultados encontrados demonstram que a curva analítica pode ser utilizada para quantificar amostras contendo carvacrol, conferindo a validade do método de acordo com a linearidade.

### 5.6.3 Precisão

Repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, sendo realizado pelo mesmo analista e a mesma instrumentação (BRASIL, 2017). A repetibilidade do método cromatográfico em estudo representado na Tabela 3, foi avaliada através de 9 determinações contemplando o intervalo linear da curva analítica, ou seja, 3 concentrações: baixa ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alta ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em triplicata.

**Tabela 3:** Repetibilidade do método de quantificação do carvacrol por CLAE-UV.

Concentração de carvacrol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média $\pm$ DP*	DPR** (%)
<b>1</b>	30,32 $\pm$ 0,89	2,95
<b>10</b>	148,16 $\pm$ 2,98	2,01
<b>40</b>	574,43 $\pm$ 0,90	0,15

\*DP =Desvio padrão.

\*\*DPR(%) = Desvio padrão relativo

Os resultados obtidos na avaliação das amostras demonstraram que o DPR% encontra-se entre 0,15 a 2,95%, comprovando que o método é preciso, de acordo com o estabelecido pela RE 166/17, onde o DPR% preconizado para este estudo deve estar abaixo de 5%.

A precisão intermediária é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma mesma amostra. Esta foi determinada a partir da média, desvio padrão e coeficiente de variação entre os analistas em diferentes dias. Os resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária das amostras encontram-se na Tabela 4 e na Tabela 5.

**Tabela 4:** Precisão intermediária do analista 1 em dias diferentes do método de quantificação do carvacrol por CLAE-UV.

Concentração de carvacrol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média $\pm$ DP*	DPR** (%)
<b>1º dia</b>		
<b>1</b>	30,32 $\pm$ 0,89	2,95
<b>10</b>	148,16 $\pm$ 2,98	2,01
<b>40</b>	574,43 $\pm$ 0,90	0,15
<b>2º dia</b>		
<b>1</b>	30,75 $\pm$ 0,60	1,95
<b>10</b>	150,76 $\pm$ 2,31	1,53
<b>40</b>	613,56 $\pm$ 14,99	2,44

\*DP = Desvio padrão.

\*\*DPR (%) = Desvio padrão relativo.

**Tabela 5:** Precisão intermediária do analista 2 em dias diferentes do método de quantificação do carvacrol por CLAE-UV.

Concentração de carvacrol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média $\pm$ DP*	DPR** (%)
<b>1º dia</b>		
<b>1</b>	29,68 $\pm$ 0,94	3,17
<b>10</b>	149,32 $\pm$ 2,03	1,36
<b>40</b>	574,10 $\pm$ 1,92	0,33
<b>2º dia</b>		
<b>1</b>	30,71 $\pm$ 0,93	3,02
<b>10</b>	147,43 $\pm$ 1,01	0,68
<b>40</b>	591,84 $\pm$ 2,25	0,38

\*DP = Desvio padrão.

\*\*DPR (%) = Desvio Padrão relativo.

Os valores de DPR(%) determinados pelo ensaio de precisão intermediária por dois analistas e em dias diferentes encontram-se abaixo do valor preconizado pela ANVISA, que é no máximo 5%, portanto o método pode ser considerado preciso sob as condições estabelecidas.

#### 5.6.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2017). Os valores de exatidão obtidos para cada concentração estudada estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Valores obtidos da exatidão para o carvacrol por CLAE a 274 nm em três níveis de concentração (1, 10 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Concentração de Carvacrol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média $\pm$ DP*	DPR** (%)	Exatidão (%)
1	23,53 $\pm$ 2,89	12,32	102,90
10	159,05 $\pm$ 7,87	4,95	99,33
40	609,01 $\pm$ 10,81	1,70	102,13

\*DP = Desvio padrão.

\*\*DPR (%) = Desvio Padrão relativo.

Para os valores descritos na Tabela 6, é possível observar que a porcentagem de exatidão varia de 99,3 a 102,90%, demonstrando que todos os resultados foram satisfatórios, ou seja, todas as porcentagens de recuperação ficaram entre os limites preconizados, confirmando dessa forma, uma exatidão e recuperação do método adequadas.

#### 5.6.5 Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017). O método apresentou um valor de LD de 0,27  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e LQ de 0,91  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Demonstrando limites satisfatórios, uma vez que os valores foram inferiores à menor concentração utilizada na construção da curva de linearidade (1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



### 5.6.6 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação entre a alteração de temperatura da coluna cromatográfica e do fabricante do solvente (acetonitrila) da fase móvel (Tabela 7).

**Tabela 7:** Parâmetros analíticos variáveis para determinação da robustez.

Amostras	Fabricante do solvente	Temperatura (°C)	Área média $\pm$ DP*	DPR** (%)
1	Panreac <sup>®</sup>	35°C	147,43 $\pm$ 1,01	0,68
2	J.T. Baker <sup>®</sup>	35°C	140,75 $\pm$ 1,49	1,06
3	Panreac <sup>®</sup>	45°C	144,91 $\pm$ 0,27	0,18
4	J.T. Baker <sup>®</sup>	45°C	144,04 $\pm$ 5,06	3,51

\*DP = Desvio padrão.

\*\*DPR (%) = Desvio Padrão relativo.

\*\*\*Diferença significativa em  $p < 0,05$  (ANOVA).

A partir dos resultados obtidos pela análise estatística ANOVA, é possível observar que não há diferença significativa entre as amostras, com o valor de  $p < 0,05$ , além disso, apresentaram coeficiente de variação entre 0,18 e 3,51%, demonstrando ser um método robusto nos fatores analisados.

## 5.5 Caracterização das dispersões de CLNs

### 5.5.1 Influência da matriz lipídica na formação dos CLNs

Os lipídeos sólidos desempenham um papel fundamental na composição da matriz dos CLNs e consequentemente, pequenas diferenças em suas características e propriedades, podem acarretar em alterações significativas nesses sistemas (YAN et al., 2010; MITRI et al., 2011; MULLER et al., 2002). Teeranachaidekul et al. (2017) observaram que na obtenção dos CLNs, selecionar adequadamente os componentes lipídicos têm fundamental importância nos parâmetros de diâmetro médio de partícula, potencial zeta, eficiência de encapsulação, perfil de liberação, podendo consequentemente influenciar na funcionalidade dos CLNs.

A influência da matriz lipídica no diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta de CLNs inertes e com carvacrol está apresentado na Figura 17. Dois lipídeos sólidos CA e AE com valores de equilíbrio-hidrófilo lipófilo (EHL) requerido de 9 e 15, respectivamente, foram testados com a finalidade de selecionar o lipídeo sólido mais adequado para preparação dos CLNs. Além disso, duas concentrações de fase lipídica da pré-

emulsão foram testadas, 2% e 5% (m/v), mantendo-se constante a concentração do tensoativo Kolliphor 188<sup>®</sup> (1%).

Em relação ao diâmetro médio é possível observar que as amostras de CLNs inertes preparadas com o lipídeo sólido de menor valor de EHL requerido (CA) apresentaram os menores diâmetros médios (2% de lipídeos:  $118,2 \pm 0,06$  nm e 5% de lipídeos:  $196,9 \pm 1,40$  nm). O mesmo foi observado nos CLNs c/ carvacrol, sendo que, nesse caso, a amostra preparada com CA e com uma menor concentração de lipídeos (2%) apresentou um menor diâmetro médio ( $153 \pm 2,90$ ), em relação à amostra com 5% de lipídeos ( $383,5 \pm 14,96$ ).

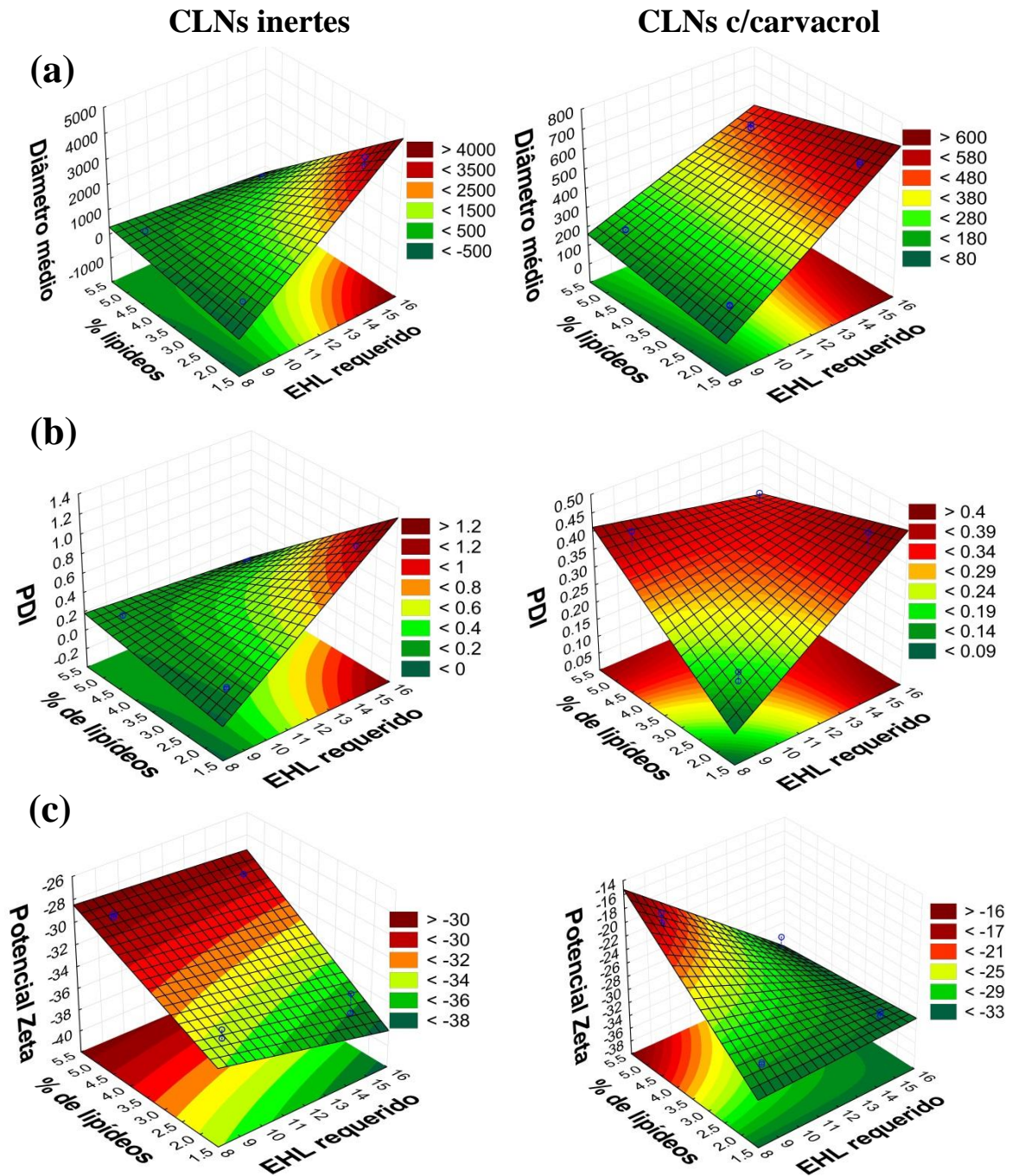
O índice de polidispersão também seguiu a mesma tendência, sendo que nos CLNs inertes preparados com CA e utilizando 2 ou 5% de lipídeos foram observados IPD de  $0,131 \pm 0,01$  e  $0,159 \pm 0,03$ , respectivamente, e nos CLNs c/ carvacrol e utilizando 2 ou 5% de lipídeos foram observados IPD de  $0,166 \pm 0,04$  e  $0,366 \pm 0,03$ , respectivamente. Esses valores de IPD demonstram uma faixa estreita de distribuição de tamanho de partícula  $IPD \leq 0,5$  (LAKSHMI; KUMAR, 2010).

Outro parâmetro avaliado foi o potencial zeta. O potencial zeta ( $\zeta$ ) das partículas pode ser utilizado para mensurar a carga da partícula ou repulsão eletrostática. De acordo com a teoria de DLVO, o sistema pode ser considerado estável, se a repulsão eletrostática dominar as forças atrativas de Van der Waals. Geralmente, a agregação das partículas tende a ocorrer menos com altos valores de  $\zeta$  ( $>|30|$  mV), devido à repulsão elétrica (HAN, et al., 2008). Na Figura 28, é possível observar que as amostras de CLNs apresentaram potencial zeta entre -20 e -30 mV. Sendo esses resultados esperados para sistemas coloidais preparados com tensoativos não-iônicos como o Kolliphor 188<sup>®</sup>, visto que o principal mecanismo de estabilização coloidal desses tensoativos se dá por repulsão estérica, não somente por repulsão elétrica (TSAI et al., 2012).

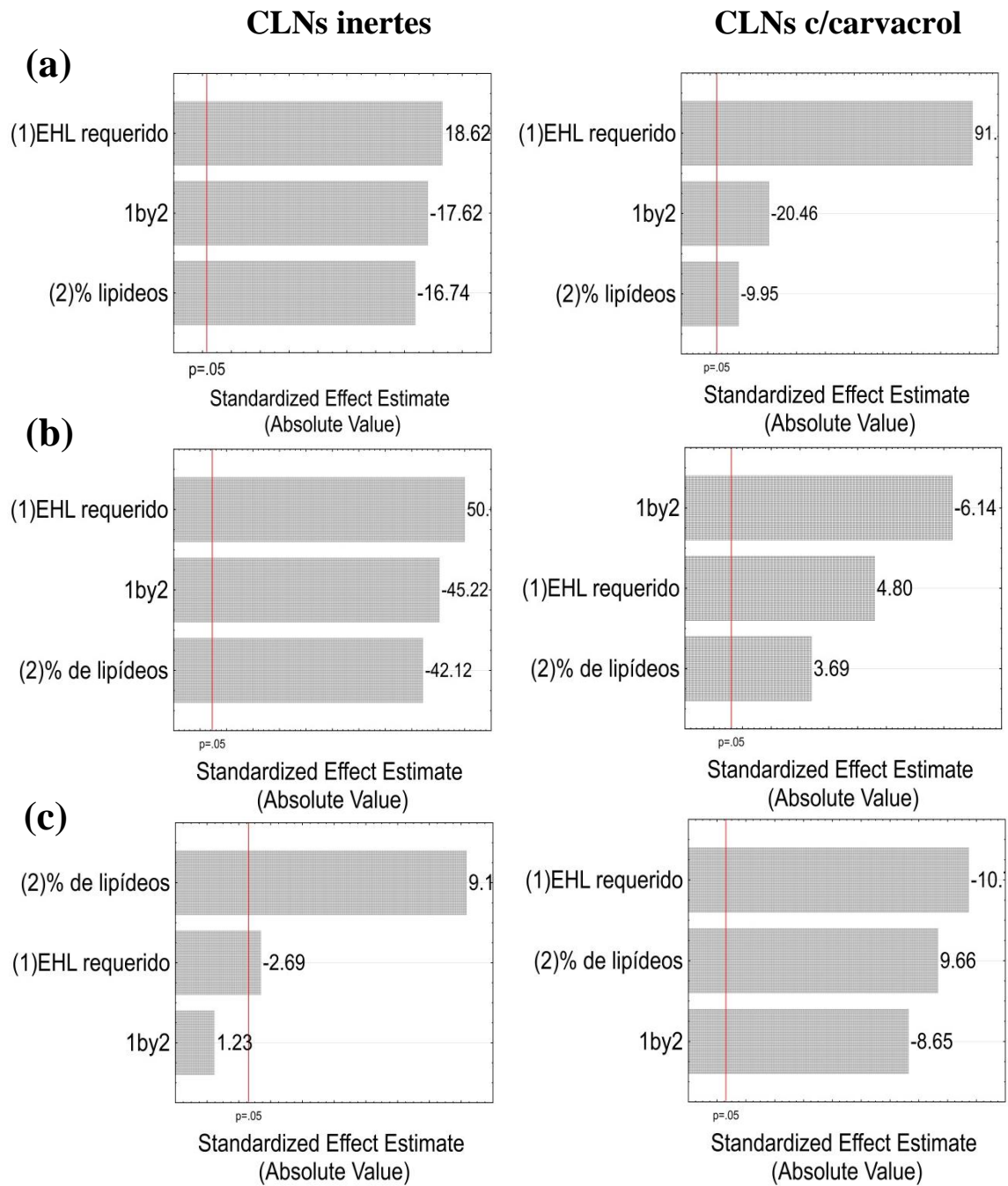
Como pode ser observado nos gráficos de pareto dos efeitos padronizados (Figura 18) ambas variáveis estudadas e a interação entre elas tiveram um efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o diâmetro de partícula, IPD e potencial zeta, com exceção da interação entre as variáveis no potencial zeta, dos CLNs inertes.

Tendo em vista os resultados apresentados, o lipídeo sólido CA (EHL = 9) foi selecionado para a preparação dos CLNs inertes e contendo carvacrol por favorecer a formação de partículas com menor diâmetro médio e estreita distribuição de tamanho.

**Figura 17:** Representação gráfica de superfície-resposta (3D) do (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (PDI) e (c) potencial zeta em função da % de lipídeos e do EHL requerido do lipídeo sólido dos CLNs inertes e com carvacrol.



**Figura 18:** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados: (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (IPD) e (c) potencial zeta em função da % de lipídeos e do EHL requerido do lipídeo sólido dos CLNs inertes e com carvacrol.



### 5.5.2 Influência da concentração de lipídeos e tensoativo na formação dos CLNs e eficiência de encapsulação do carvacrol

Após a seleção do lipídeo sólido adequado para a preparação dos CLNs, a influência da concentração de lipídeos e tensoativo no diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta de CLNs inertes e com carvacrol foram avaliados. Na Figura 19 é possível observar menores diâmetros médios nas CLNs (inertes e c/ carvacrol) com uma maior concentração de tensoativo e menor concentração de lipídeos. O valor de  $p$  para ambas variáveis analisadas e sua interação demonstraram um efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o diâmetro médio de partícula (Figura 20). É esperado que formulações com maior concentração de tensoativo apresentasse menores diâmetros médios devido a uma diminuição da tensão superficial do sistema, favorecendo da formação do filme interfacial.

O oposto foi observado quando foi utilizada uma maior concentração de lipídeos, em que o diâmetro médio de partícula aumentou. Isso também foi reportado por Schubert e Muller-Goymann (2003), que ao analisar a influência da concentração lipídica nas características das nanopartículas lipídicas, observaram que houve um aumento significativo no diâmetro médio de partícula ao elevar a concentração de lipídeos. Igualmente, Yan et al. (2010) reportaram um aumento no diâmetro médio de partícula com o aumento da concentração lipídica e justificaram que esse aumento ocorreu devido à ampliação na viscosidade da pré-emulsão, o que consequentemente dificulta a sua emulsificação na fase aquosa, reduzindo a taxa de difusão das moléculas na fase externa no sistema.

Em relação ao IPD, todas as formulações (CLNs inertes e contendo carvacrol) apresentaram uma faixa estreita de distribuição de diâmetro médio de partícula  $IPD \leq 0,5$ . Sendo que todas as formulações contendo carvacrol apresentaram  $IPD \leq 0,2$  sendo adequadas para administração parenteral (LOPES et. al., 2012). Nesse caso, as variáveis analisadas tiveram efeito significativo no IPD, apenas a interação entre elas (Figura 20).

Ainda na Figura 20 é possível observar que o potencial zeta, de todas as formulações preparadas, se manteve entre -20 e -30 mV conferindo estabilidade coloidal. As variáveis analisadas apresentaram efeito significativo sobre o potencial zeta, mas não para interação entre elas (Figura 20).

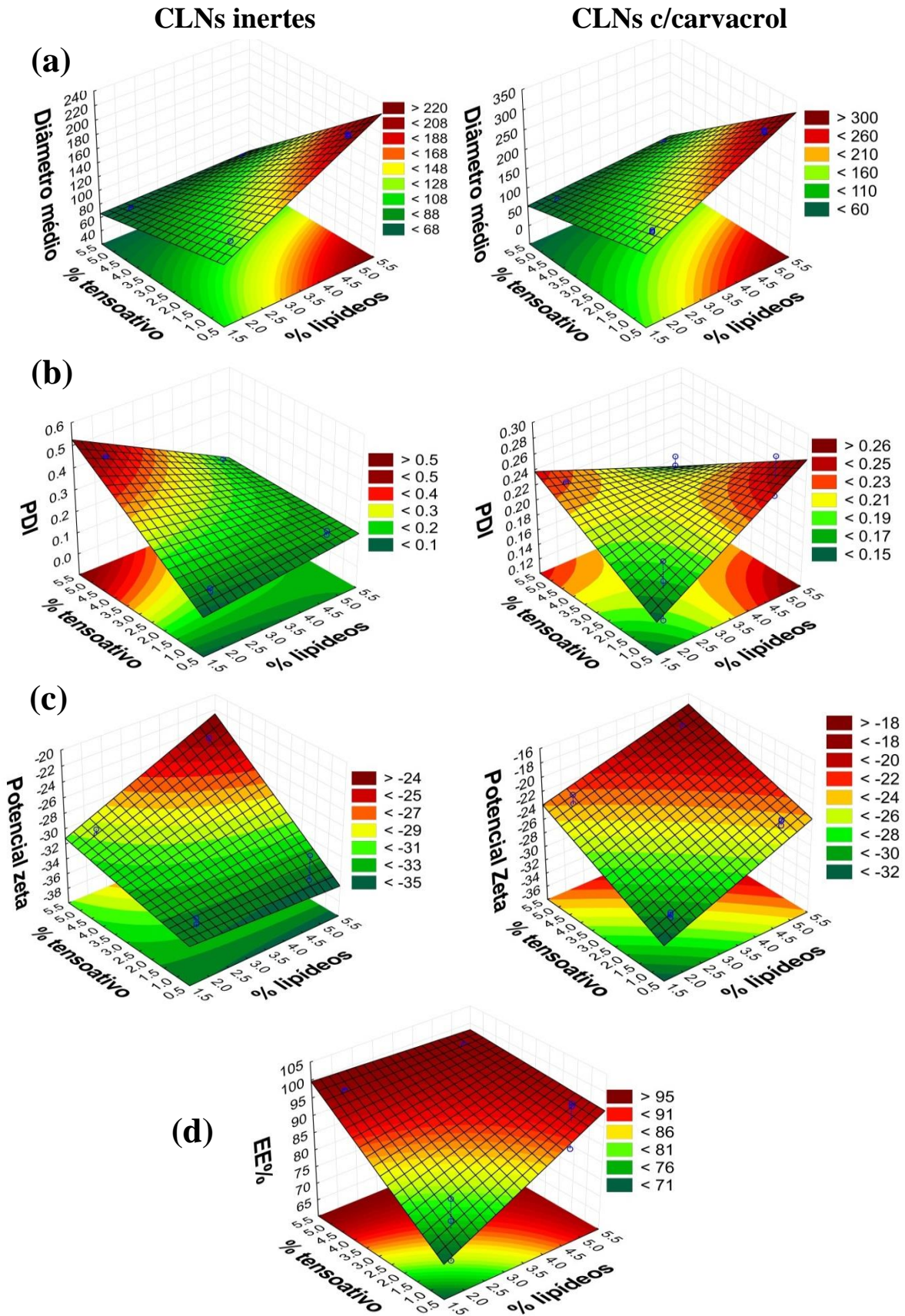
A influência da concentração de lipídeos e tensoativo na eficiência de encapsulação do carvacrol também foram avaliadas (Figura 19). É possível observar que a eficiência de encapsulação (EE%) aumentou com o aumento da concentração de tensoativo e lipídeo

utilizados. Resultados similares foram descritos por Shah et al. (2009), ao avaliar a EE% da Tretinoína nas nanopartículas lipídicas desenvolvidas, em que foi observado que o aumento da concentração de lipídeos aumentou a EE% ( $p < 0,05$ ). Segundo Pokharkar et al. (2011) (2012), uma provável explicação para o aumento da EE% com o aumento da concentração de lipídeos, é que uma quantidade maior de lipídeos poderá servir para encapsular uma maior quantidade de ativo disponível no meio.

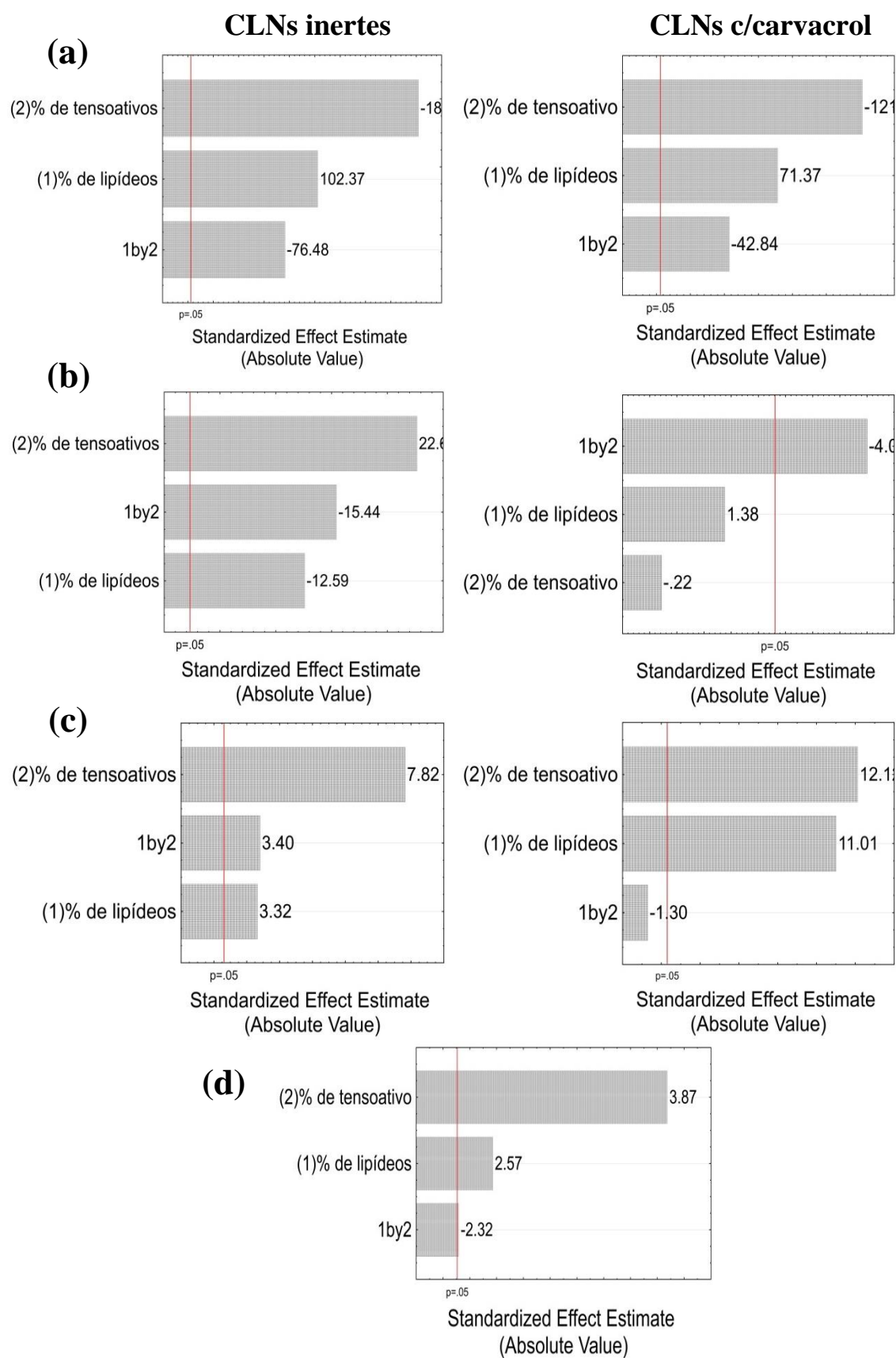
Com base nos resultados apresentados, as formulações mais adequadas para obtenção dos CLNs contendo carvacrol foram àquelas preparadas com maior concentração de tensoativo (5%), pois apresentaram um menor diâmetro médio e maior eficiência de encapsulação. Sendo assim, a formulação selecionada para a preparação dos CLNs foi aquela com maior concentração de tensoativo (5%) e maior concentração de lipídeos (5%) sendo utilizada nos demais experimentos e denominada de CLNs c/ CRV.



**Figura 19:** Representação gráfica de superfície-resposta (3D) do (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (IPD), e (c) potencial zeta e (d) eficiência de encapsulação (EE%) em função da % de lipídeos e % de tensoativos dos CLNs inertes e com carvacrol.



**Figura 20:** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados: (a) diâmetro médio de partícula, (b) índice de polidispersão (IPD), e (c) potencial zeta e (d) eficiência de encapsulação (EE%) em função da % de lipídeos e % de tensoativos dos CLNs inertes e com carvacrol.



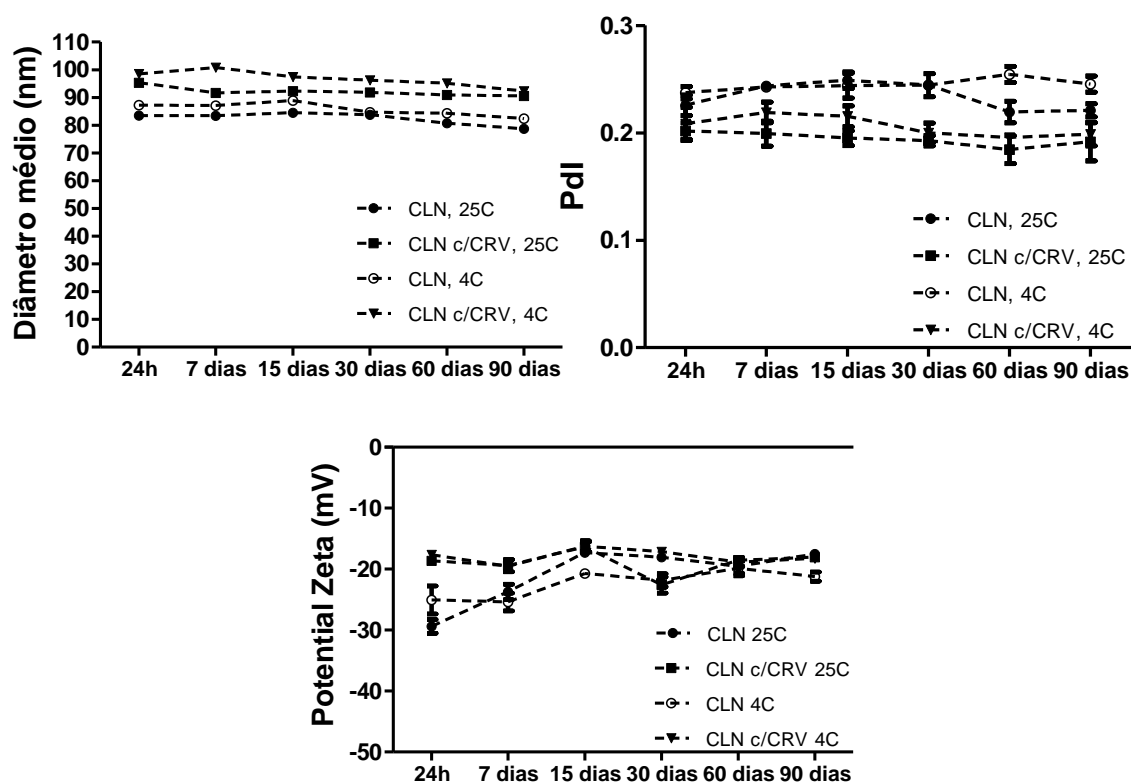


## 5.6 Estabilidade dos CLNs

A avaliação da estabilidade coloidal dos CLNs é essencial para confirmar que as propriedades estruturais foram preservadas durante o tempo de armazenamento, pois a modificação da estrutura de nanocarreadores utilizados como sistemas de liberação de fármacos poderia afetar seu potencial terapêutico (ZHANG et al., 2018). A Figura 21 apresenta o estudo de estabilidade das formulações de CLNs inerte e com carvacrol na temperatura ambiente (25°C) e 4°C de 24h até 90 dias após a preparação.

Em todas as condições estudadas os diâmetros médios de partícula permaneceram quase constantes durante o período. Grandes flutuações no diâmetro médio com o tempo poderiam indicar formação de agregados, consequentemente aumentando a faixa de tamanho de partícula. O IPD também permaneceu constante, em torno de 0,2, que é um valor geralmente utilizado para indicar uma estreita distribuição de tamanho de partícula. Além disso, as CLNs nas condições testadas mantiveram o potencial zeta variando dentro da mesma faixa, indicando que essas partículas permaneceram estáveis durante o armazenamento sem agregação os CLNs.

**Figura 21:** Estudo de estabilidade dos CLNs inertes e com carvacrol: a) diâmetro médio, b) IPD e c) potencial zeta.



### 5.7 Caracterização dos CLNs: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

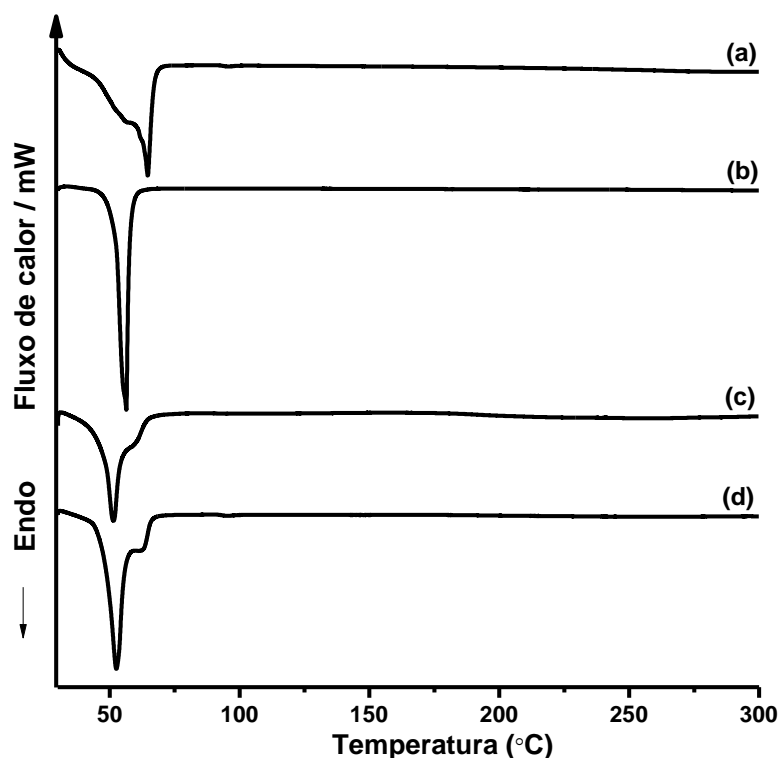
DSC é uma importante ferramenta para caracterizar formulações de CLNs e suas matérias-primas, fornecendo informações sobre o seu estado físico e cristalinidade através do comportamento térmico (GALVÃO et al., 2016).

A Figura 22 mostra as curvas de DSC do lipídeo sólido cera de abelha (a), do tensoativo poloxamer 188 (b), dos CLNs inertes (c) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/CRV). Os parâmetros obtidos através das curvas de DSC, Tonset,  $T_{pico1}$  e  $T_{pico2}$  do ponto de fusão, entalpia ( $\Delta H$ ) das amostras estão apresentados na Tabela 8.

A curva da cera de abelha apresenta um evento endotérmico no intervalo de 40-70°C ( $T_{peak1} = 64,7^\circ\text{C}$ ) característicos da sua fusão. Esse resultado foi similar ao evento descrito pelo nosso grupo em estudos anteriores (DANTAS et al., 2018; GALVÃO et al., 2016). O tensoativo utilizado na formulação de CLNs, o poloxamer 188, apresentou um evento endotérmico no intervalo de 45-65°C ( $T_{peak} = 56,32^\circ\text{C}$ ) referente ao seu ponto de fusão (IGE; BARIA; GATTANI, 2013). De acordo com Shah e Serajuddin (2012), devido à presença da porção de poli (óxido de etileno) na estrutura do poloxamer 188, este pode ser utilizado como agente emulsificante e/ou de solidificação de lipídeos, similar aos PEGs sólidos.

Para os CLNs inertes foram observados dois eventos endotérmicos no intervalo de 40 a 70°C ( $T_{peak1} = 51,59^\circ\text{C}$  e  $T_{peak2} = 60,05$ ) provavelmente referentes aos pontos de fusão da cera de abelha e do poloxamer 188, mas com um pequeno deslocamento para temperaturas mais baixas. Quando o carvacrol foi incorporado em substituição ao ácido oleico foi possível observar dois eventos endotérmicos no intervalo de 40 a 70°C ( $T_{peak1} = 52,61^\circ\text{C}$  e  $T_{peak2} = 63,50$ ). Também foi observado que a entalpia de fusão  $\Delta H$  foi reduzida, em relação à entalpia da cera de abelha para ambos CLNs inertes e CLNs contendo carvacrol. A diminuição do ponto de fusão para temperaturas mais baixas e a diminuição da entalpia nos CLNs em relação ao lipídeo sólido puro, sugere uma desordem da estrutura cristalina, sugerindo que óleo está disperso na matriz lipídica (HU et al., 2006).

**Figura 22:** Curvas de DSC do lipídeo sólido cera de abelha (a), do tensoativo poloxamer 188 (b), dos CLNs inertes (c) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/CRV) (d).



**Tabela 8:** Dados de DSC de  $T_{\text{onset}}$ ,  $T_{\text{pico1}}$  e  $T_{\text{pico2}}$  do ponto de fusão, entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) da cera de abelha (CA), CLNs inerte (CLNs) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/ CRV).

Amostras	$T_{\text{onset}}$	$T_{\text{pico1}}$	$T_{\text{pico2}}$	$\Delta H$ (J/g)
CLNs	40,5	51,6	60,1	111,5
CLNs c/ CRV	42,1	52,6	63,5	156,0
CA	41,8	64,7	-	183,5

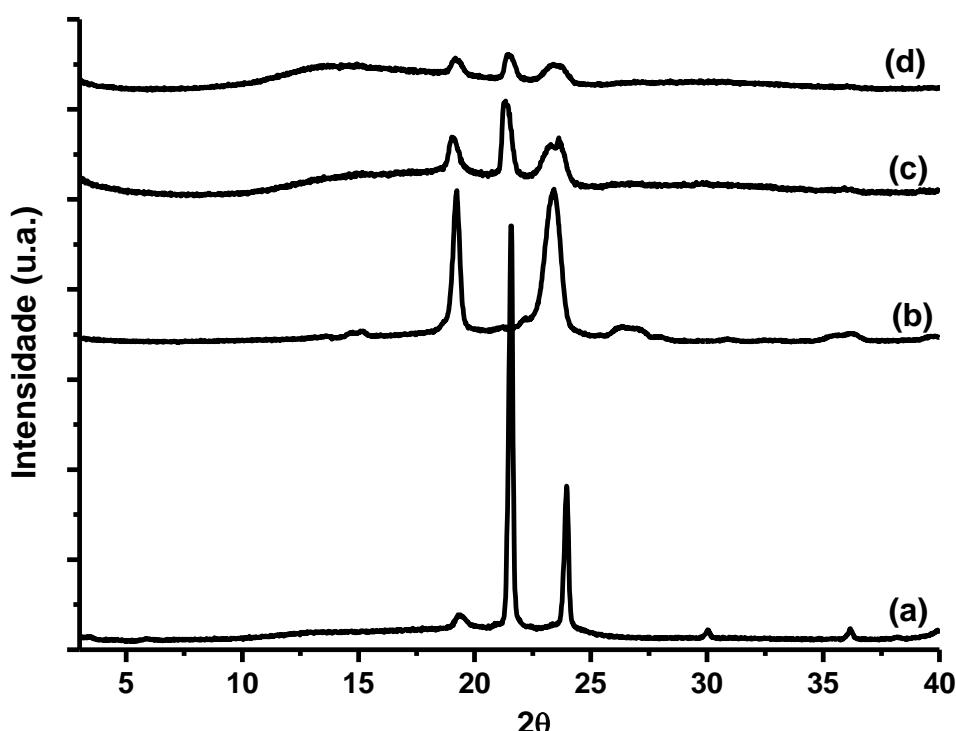
### 5.8 Caracterização dos CLNs: Difração de raios-X

Difração de raios-X é uma técnica que avalia a forma que os lipídeos sólidos se organizam, seu comportamento de fase, e a sua ordenação cristalina. CLNs são compostos de lipídeos sólidos e modificações na cristalinidade podem afetar diretamente sua estabilidade física (YANG et al., 2013; ZHENG et al., 2013).

A Figura 23 apresenta o perfil de DRX da cera de abelha, do tensoativo, do CLNs inerte e do CLNs contendo carvacrol. A cera de abelha apresentou três picos de difração principais bem definidos em  $2\theta$ :  $19,40^\circ$ ,  $21,53^\circ$  e  $23,96^\circ$ , característicos de sua natureza cristalina. O poloxamer 188 apresentou dois picos de difração principais em  $2\theta$ :  $19,23^\circ$  e  $23,33^\circ$ .

Após a formação dos CLNs inertes e contendo carvacrol foi observada uma diminuição na intensidade dos picos de difração principais referente ao lipídeo sólido e ao tensoativo presente na formulação. De acordo com Tamjidi et al. (2013), essa redução na intensidade pode ser atribuída a uma menor ordenação da matriz lipídica, resultando em uma redução na cristalinidade, o que confirma os resultados obtidos por DSC.

**Figura 23:** Difração de raios X do lipídeo sólido cera de abelha (a), do tensoativo poloxamer 188 (b), dos CLNs inertes (c) e CLNs contendo carvacrol (CLNs c/CRV) (d).



### 5.7 Estudo de liberação do carvacrol a partir dos CLNs

O perfil de liberação *in vitro* do carvacrol- livre (CRV) e encapsulado (CLNs c/ CRV) está apresentado na Figura 24. O carvacrol foi rapidamente dissolvido quando em solução em comparação com o encapsulado em CLNs, com quantidade acumulada liberada de 100% após 1h do início do experimento. É possível observar também que o CLNs c/ CRV exibiu um perfil de liberação bifásico, onde ocorre uma liberação rápida (*burst release*) nas primeiras quatro horas de experimento (em torno de 60% do carvacrol), possivelmente devido a difusão rápida do composto ativo presente na superfície das partículas, seguida de uma liberação prolongada possivelmente pela difusão do carvacrol ou erosão da matriz.

A modelagem do perfil de liberação de substâncias ativas a partir de sistemas de liberação é importante para o entendimento e elucidação dos mecanismos de transporte

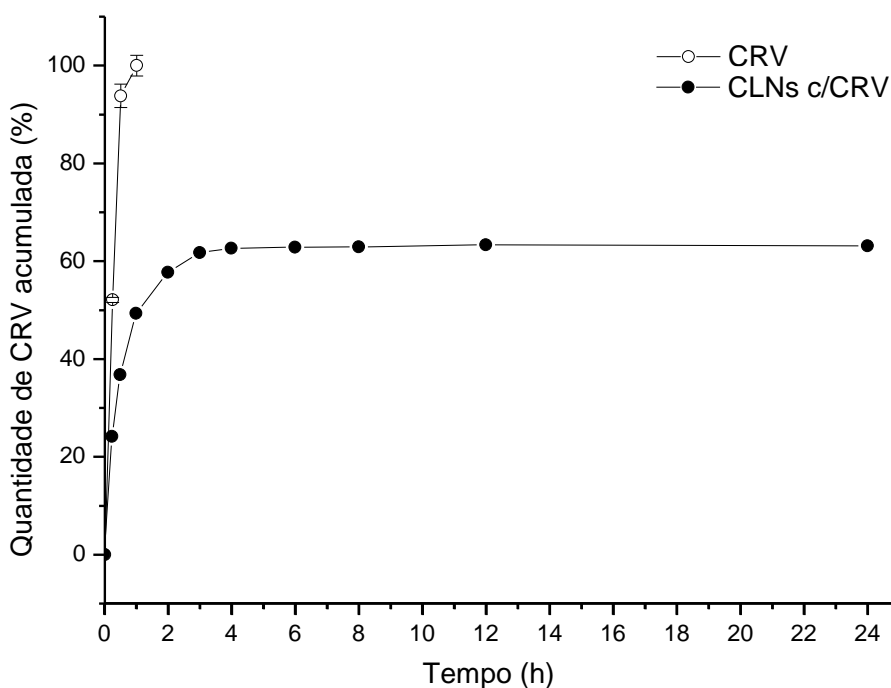
envolvidos (PAPADOPOULOU et al., 2006). Portanto, os dados de liberação *in vitro* do carvacrol a partir dos CLNs foram ajustados segundo o modelo cinético de Korsmeyer e Peppas; e Weibull. A expressão geral de Korsmeyer e Peppas é descrita na Equação 7:

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (7)$$

onde “ $M_t/M_\infty$ ” corresponde a fração de substância ativa dissolvida a um tempo  $t$ , “ $k$ ” é a constante cinética e “ $n$ ” é o expoente que está relacionado aos mecanismos de difusão envolvidos na liberação. Então para sistemas de liberação do tipo esfera,  $n \leq 0,43$  corresponde a uma difusão Fickiana (*Fickian diffusion*),  $0,85 \leq n \leq 0,43$  mecanismo de liberação misto e  $n \geq 0,85$  ao Caso Transporte II (ou difusão não Fickiana) (TSAO & HALL, 2017).

No presente trabalho o valor de “ $n$ ” encontrado foi menor que 0,43 ( $n = 0,372$  e  $r^2 = 0,950$ ) o qual corresponde ao mecanismo de liberação do tipo difusão Fickiana, ou seja a força-motriz para liberação do carvacrol a partir da matriz é o gradiente de concentração e a sua liberação está diretamente relacionada a sua solubilidade na matriz lipídica dos CLNs e no meio de liberação. Esse mesmo perfil de liberação foi reportado por Kumbhar & Pokharkar (2013) para a bicalutamida, um fármaco com baixa solubilidade aquosa, a partir de CLNs.

**Figura 24:** Perfil de liberação *in vitro* de carvacrol livre (CRV) ou encapsulado (CLNs c/ CRV) após 24h de experimento.



O presente perfil de liberação também foi ajustado ao modelo de Weibull descrito pela Equação 8:

$$M_t/M_\infty = 1 - \exp(-at^b) \quad (X)$$

onde “ $M_t/M_\infty$ ” corresponde a fração de substância ativa liberada a um tempo  $t$ , e “ $a$ ” e “ $b$ ” constantes. O valor de “ $b$ ” foram correlacionados com os mecanismos de difusão envolvidos na liberação de ativos por Papadopoulos et al. (2006). Os autores correlacionaram os valores de “ $b$ ” obtidos através do modelo de Weibull com os valores de “ $n$ ” obtidos através do modelo de Korsmeyer e Peppas. Então, valores de “ $b$ ”  $< 0,75$  foram correspondentes ao mecanismo de difusão Fickiana tanto no espaço euclidiano ( $0,69 < b < 0,75$ ) ou fractal ( $b < 0,69$ ) e valores de “ $b$ ”  $> 0,75$  foram correspondentes a um transporte anômalo com mais de um mecanismo de liberação envolvido.

Dessa forma no presente trabalho, o valor de “ $b$ ” encontrado foi menor que 0,75 ( $b = 0,69$  e  $r^2 = 0,9704$ ) o qual corresponde ao mecanismo de difusão Fickiana, confirmando o que foi observado através do modelo de Korsmeyer e Peppas.

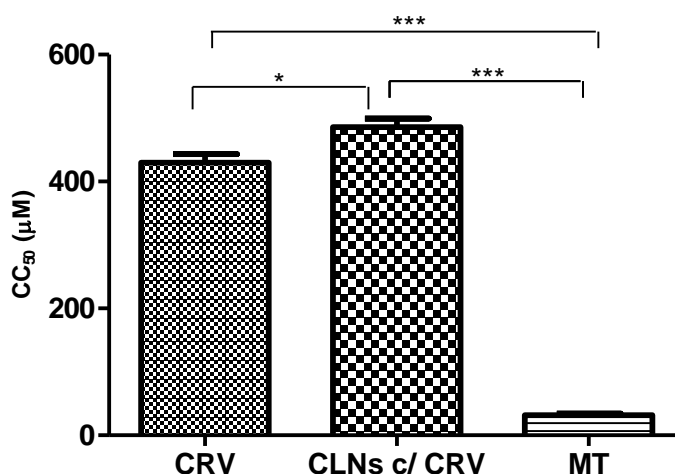
### 5.8 Citotoxicidade *in vitro* em células THP-1 diferenciadas

Considerando uma futura aplicação dos CLNs contendo CRV no tratamento de leishmanioses, estudos de viabilidade celular são essenciais no desenvolvimento de formulações adequadas. A leishmania quando em contato com o hospedeiro, é fagocitada pelos macrófagos, se multiplicam e se transformam em amastigotas. Portanto, os CLNs devem ser capazes de serem fagocitados pela célula hospedeira (macrófago) sem causar danos a mesma. Células THP-1 (linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana) diferenciadas em macrófagos é um dos modelos mais utilizados no teste de fármacos anti-leishmania.

A Figura 25 apresenta a concentração citotóxica média ( $CC_{50}$ ) de células THP-1 diferenciadas após 48h de tratamento utilizando carvacrol-livre (CRV), CLNs contendo CRV e miltefosina (fármaco utilizado no tratamento de leishmanioses). É possível observar que o CRV livre e encapsulado (CLNs c/ CRV) apresentaram uma menor citotoxicidade às células THP-1 diferenciadas em relação à miltefosina (MT) ( $p < 0,005$ ). Já o carvacrol quando encapsulado em CLNs apresentou uma menor citotoxicidade em relação ao carvacrol livre (CRV) ( $p < 0,05$ ). Isso sugere o papel protetor de formulações CLNs para células de

mamíferos. Lopes et al. (2012) também reportaram uma diminuição na citotoxicidade em células THP-1 diferenciadas após o encapsulamento do fármaco orizalina em nanopartículas lipídicas utilizando tripalmitina como lipídeo sólido.

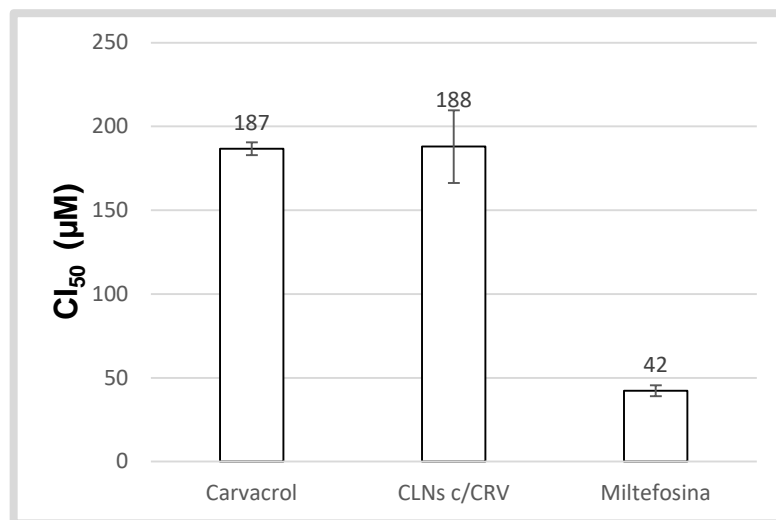
**Figura 25:** Concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) de células THP-1 diferenciadas depois de 48h de incubação com diferentes concentrações de carvacrol livre (CRV) ou encapsulado (CLNs c/ CRV), e miltefosina (MT). \* $p < 0,05$ , diferença estatística significativa.



### 5.9 Viabilidade *in vitro* sobre formas promastigotas

A viabilidade *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com carvacrol, CLNs c/ CRV e miltefosina é apresentada na Figura 26. A miltefosina foi utilizada como um controle positivo, visto que é um fármaco que é utilizado no tratamento de leishmanioses. O carvacrol no presente estudo apresentou uma CI<sub>50</sub> viabilidade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* de 187 µM, sendo próxima à viabilidade observada por Silva et al. (2017) de 169 µM. Como é possível observar na Figura 26, os CLNs c/ CRV apresentaram viabilidade sobre formas promastigotas do parasita próximo ao observado para o carvacrol. De maneira similar, Moreno et al. (2015) também observaram que a β-lapachona encapsulada em nanopartículas de lecitina e quitosana preservou a viabilidade sobre as formas pronastigotas de *L. major* da β-lapachona.

**Figura 26:** Viabilidade in vitro das formas promastigotas de *L. amazonensis* após 48h de tratamento com carvacrol, CLNs c/ CRV e miltefosina.



### 5.10 Validação da metodologia analítica para quantificação do carvacrol em plasma de rato por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE/FLD)

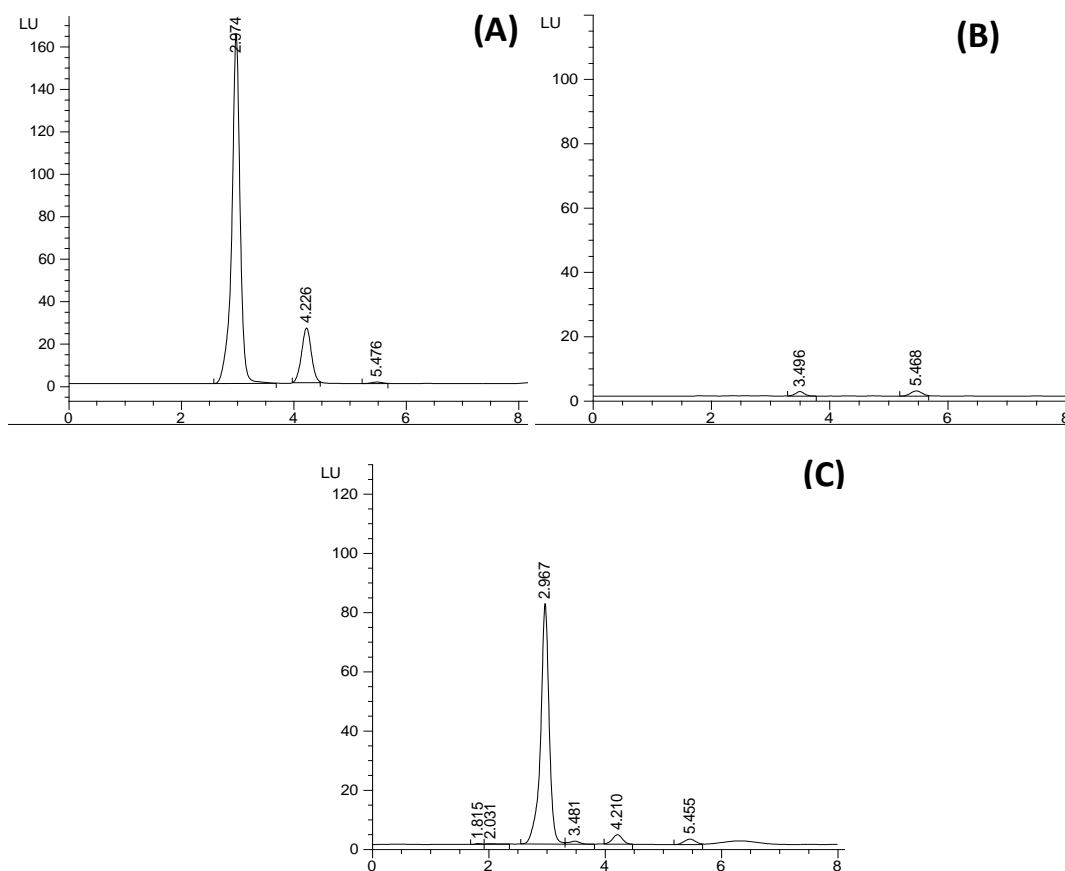
Na maioria dos métodos de quantificação em plasma reportados na literatura, o carvacrol foi quantificado por cromatografia gasosa, principalmente por se tratar de um monoterpene volátil. Entretanto, a cromatografia gasosa nem sempre é uma técnica disponível nas rotinas de um laboratório. Viñas, Soler-Romera & Hernández-Córdoba (2006), desenvolveram e validaram um método de quantificação do carvacrol em mel de abelha (matriz) utilizando CLAE-FLD. Sendo assim, a cromatografia líquida CLAE-FLD pode ser uma técnica interessante para o desenvolvimento de método de quantificação do carvacrol em plasma de rato.

#### 5.10.1 Seletividade e sensibilidade

A seletividade do método foi avaliada pela ausência de interferente do plasma na quantificação do carvacrol. A Figura 27 apresenta os cromatogramas representativos do carvacrol e P.I. em solução (A), branco do plasma de rato (B), carvacrol e P.I. em plasma de rato (C). Não foram observados picos interferentes do plasma no mesmo tempo de retenção do analito e do PI. O limite de quantificação (*lower limit of quantification* – LLOQ) do carvacrol em plasma de rato foi estabelecido como 0.05 µg/mL.



**Figura 27:** Cromatogramas de CLAE-FLD representativos de carvacrol e P.I. em solução (A), branco do plasma de rato (B), carvacrol e P.I. em plasma de rato (C). Os picos em 2.9 e 4.2 são o P.I. e o carvacrol, respectivamente.



### 5.10.2 Linearidade

As curvas de calibração do carvacrol em plasma de rato apresentaram linearidade aceitável na faixa de 0.05 - 5 µg/mL. O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) foi  $\geq 0.99$  para todas as curvas de calibração. A precisão e exatidão do LLOQ em plasma foi de 98,7% e 11,21%, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o guia de validação do FDA.

### 5.10.3 Precisão, exatidão e recuperação

A Tabela 9 apresenta os dados de precisão e exatidão intra-dia e inter-dia do método de quantificação desenvolvido. A exatidão e precisão estão em faixa aceitável para finalidade bioanalítica. A precisão intra-dia foi de 9,67 a 12,98% e inter-dia de 9,18 a 12,64%. Já a exatidão intra- e inter-dia foram maiores que 85% e menores que 115% para todas as concentrações.

A média de recuperação do carvacrol nos três níveis de concentração testados (0,084, 1 e 2,8) foi de 41,97 % com CV (%) < 13%. Apesar da recuperação do método de extração encontrado foi menor que 50%, é aceitável segundo o guia do FDA, pois foi consistente em diferentes níveis de concentração, preciso e reprodutível.

**Tabela 9:** Precisão e exatidão do método do método de quantificação do carvacrol em plasma de rato por CLAE-FLD.

Conc. (µg/mL)	Intra-dia (n=5)			Inter-dia (n=15)		
	Observado (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	Observado (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
0,084	0,085 ± 0,01	12,9	97,7 ± 12,2	0,087 ± 0,01	12,6	101,7 ± 13,1
1	1,0 ± 0,10	10,1	99,5 ± 10	1,0 ± 0,09	9,2	99,6 ± 9,1
2,8	2,74 ± 0,26	9,7	97,8 ± 9,4	2,69 ± 0,28	10,3	96,1 ± 9,9

#### 5.10.4 Estabilidade do carvacrol no plasma

A Tabela 10 apresenta os resultados de estabilidade do carvacrol em plasma de rato em várias condições, mimetizando as condições reais de armazenamento e análise do plasma. O analito no plasma foi estável a temperatura ambiente por até 6h e a -80 °C por um mês. As amostras após processamento do plasma foram estáveis a temperatura ambiente por até 24h no compartimento de auto-injeção do CLAE. Além disso, o carvacrol também foi submetido à três ciclos gela-desgela. Os resultados mostram que as amostras podem ser descongeladas e congeladas sem comprometer a sua integridade.

**Tabela 10:** Estabilidade do carvacrol em plasma de rato expostas a diferentes condições de temperatura: temperatura ambiente (6h), -80°C (1 mês) e até três ciclos gela-degela.

Condições	Conc. (µg/mL)	Observado (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Temperatura ambiente (6h)	0,084	0,086 ± 0,01	11,5	102,4 ± 11,8
	2,8	3,02 ± 0,20	6,5	108,2 ± 7,1
-80°C (1 mês)	0,084	0,097 ± 0,01	10,29	115,28 ± 11,01
	2,8	2,52 ± 0,12	4,82	90,00 ± 4,33
Ciclo gela-desgela (3 ciclos)	0,084	0,082 ± 0,006	7,3	97,3 ± 7,2
	2,8	2,95 ± 0,19	6,7	105,5 ± 6,9
Auto-injetor (24h)	0,084	0,091 ± 0,008	8,7	108,2 ± 9,4
	2,8	3,05 ± 0,22	7,1	109,0 ± 7,8

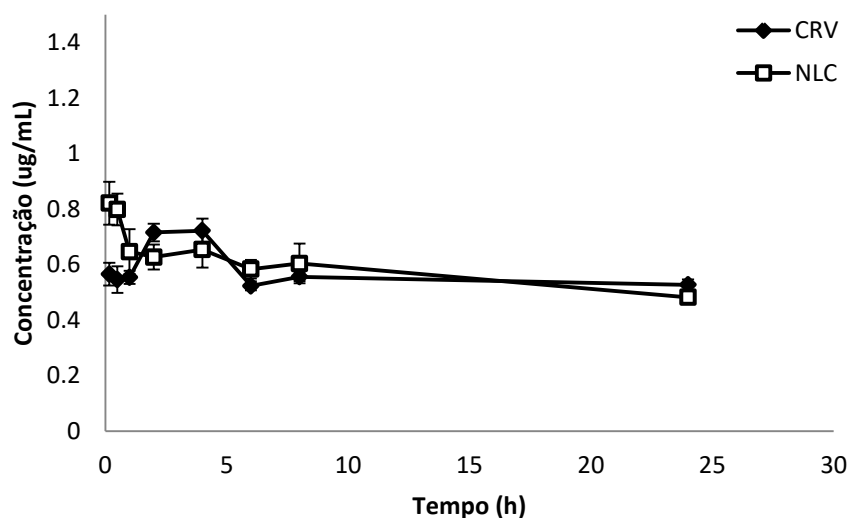
### 5.11 Avaliação da farmacocinética *in vivo*

O carvacrol tem sido reportado por apresentar várias atividades farmacológicas e biológicas tais como, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e anti-protozoária (BELDA-GALBIS et al., 2014; BEENA & RAWAT, 2013; GUIMARÃES et al., 2012; DE SOUSA, 2011; ARUNASREE, 2010; AESCHBACH et al., 1994). Apesar de existirem inúmeros artigos que descrevem as suas atividades biológicas e farmacológicas, dados sobre a farmacocinética *in vivo* do carvacrol na literatura ainda são limitados. Michiels et al. (2008), avaliaram a degradação *in vitro* e a cinética de migração *in vivo* do carvacrol e de outros produtos naturais no trato gastrointestinal após administração oral (misturado na ração) em leitões. Eles sugeriram que o carvacrol seria absorvido pelo principalmente pelo intestino delgado e excretado pela urina. Além disso, recentemente, Mason et al. (2017) avaliaram a farmacocinética *in vivo* do carvacrol e outros compostos após administração intramamária e tópica em bovinos. Entretanto, até o presente momento nenhum estudo reportou a avaliação farmacocinética *in vivo* do carvacrol após administração IV em bolus.

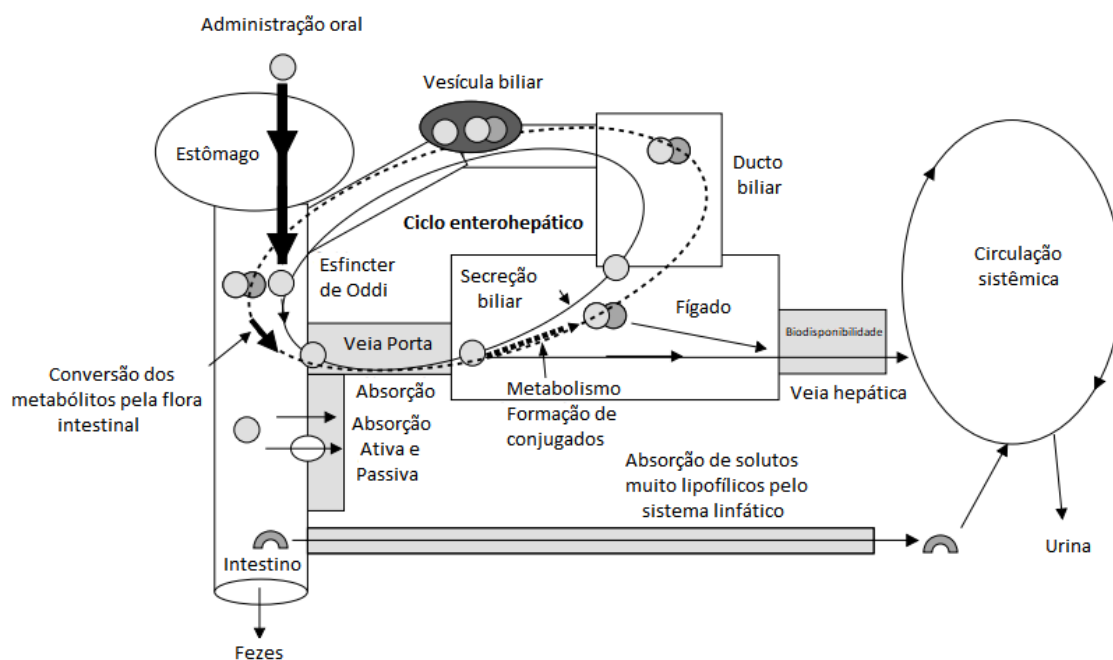
A Figura 28 apresenta o perfil farmacocinético *in vivo* de carvacrol livre (CRV) e encapsulado (CLNs c/ CRV) em ratos Wistar após administração IV em bolus (3 mg/kg). Foi possível observar que o CRV, na dose administrada, conseguiu atingir concentrações plasmáticas mensuráveis pelo método de quantificação previamente desenvolvido.

O perfil farmacocinético do CRV após administração intravenosa indica que provavelmente este monoterpene fenólico passa por circulação enterohepática, isto porque é possível observar inicialmente nas duas primeiras horas uma queda na concentração plasmática seguido por aumento da concentração seguido de queda na concentração novamente, o chamado perfil “zigue-zague”. A Figura 29 apresenta uma representação esquemática do processo de circulação enterohepática após administração oral, em que após a chegada da substância ativa na circulação sistêmica, passando pelo fígado, esta é metabolizada e alguns de seus metabólitos excretados com a bile, através da vesícula biliar, no duodeno. No intestino, os metabólitos são então convertidos à substância ativa original pela flora intestinal e em seguida reabsorvidos pela circulação portal. Sendo assim, alguma fração da substância ativa presente no intestino pode ser reabsorvida e retornar para o fígado onde a circulação enterohepática se repete (OKOUR & BRONDAGE, 2017).

**Figura 28:** Perfil farmacocinético in vivo após administração intravenosa em bolus (3 mg/kg) de carvacrol (CRV) livre e encapsulado (CLN contendo carvacrol) em ratos Wistar.



**Figura 29:** Representação esquemática da circulação enterohepática após administração oral de uma substância.



Fonte: Roberts et al. (2002) traduzido.

Inúmeros fármacos têm sido reportados por exibir circulação enterohepática, incluindo varfarina, morfina, eritromicina, doxiciclina, ceftriaxona, entre outros. Um artigo de revisão recente identificou mais de 45 fármacos que passam por circulação enterohepática (GAO et al., 2014). Em geral, fármacos ou substâncias ativas que passam por circulação enterohepática têm característica apolar e pequena massa molecular, similares ao carvacrol (OKOUR, BRONDAGE, 2017). Outros compostos fenólicos têm apresentado perfil farmacocinético

semelhante ao do carvacrol, como por exemplo, os compostos fenólicos derivados do gengibre, 6-gingerol (6G), 8-gingerol (8G), 10-gingerol (10G) e 6-shogaol (6S), reportados por Mukkavilli et al. (2017).

Os dados de concentração-plasmática pelo tempo foram submetidos à análise não-compartimental (Tabela 11). O CRV apresentou tempo de meia-vida de eliminação ( $t^{1/2}$ ) de  $51,07 \pm 2,80$  h, clearance (Cl) de  $0,057 \pm 0,003$  L/h e concentração plasmática máxima inicial ( $C_0$ ) de  $0,59 \pm 0,075$  µg/mL. Esses resultados estão de acordo com o esperado para substâncias que passam por circulação enterohepática, pois a sua reabsorção no intestino tende a promover uma longa meia-vida de eliminação com baixos valores de clearance. A circulação enterohepática do carvacrol não foi ainda reportada na literatura, provavelmente devido as doses utilizadas em trabalhos anteriores terem sido muito abaixo da dose do presente trabalho e/ou a via de administração utilizada foi extravascular (oral, tópica e intramamária).

O perfil farmacocinético do carvacrol, após administração IV em bolus, quando encapsulado em CLNs foi similar ao carvacrol livre. Entretanto, após a análise não-compartimental é possível observar que a  $C_0$ , o  $t^{1/2}$  e tempo de residência médio (MRT) do carvacrol encapsulado foi um pouco maior do que o carvacrol livre ( $p < 0,05$ ). Além disso, o volume de distribuição ( $V_{dss}$ ) do carvacrol encapsulado em CLNs foi maior que o carvacrol-livre ( $p < 0,01$ ). Esse aumento no  $V_{dss}$  provavelmente ocorreu devido à natureza lipídica do carreador que favoreceu uma maior distribuição do carvacrol nos tecidos consequentemente resultando em um  $t^{1/2}$  e tempo de residência médio (MRT) maiores que o carvacrol-livre. Já os parâmetros de Cl e área sobre a curva total ( $AUC_{total}$ ) não foram modificados significativamente após o encapsulamento do carvacrol em CLNs (ns).

Na literatura, têm sido reportado, que fármacos ou substâncias ativas encapsulados em CLNs tendem aumentar o  $t^{1/2}$  e o tempo de residência médio (MRT). Porém, como o perfil farmacocinético do carvacrol livre sugere que este passa por circulação enterohepática e consequentemente já promovendo uma longa meia-vida de eliminação e maior tempo de circulação, é esperado que após o encapsulamento em CLNs esse perfil não apresente uma grande diferença em relação ao carvacrol-livre.

**Tabela 11:** Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da análise não-compartimental do perfil farmacocinético in vivo após administração intravenosa de carvacrol (CRV) livre e encapsulado (CLN contendo carvacrol) em ratos Wistar.

<b>Parâmetros farmacocinéticos</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>CLNs c/ carvacrol</b>	<b>Valor de p</b>
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	51,07 ± 2,80	69,33 ± 7,30 *	0,0150
<b>C<sub>0</sub> (µg/mL)</b>	0,59 ± 0,075	0,89 ± 0,14*	0,027
<b>Cl (L/h)</b>	0,057 ± 0,003	0,048 ± 0,005	Ns
<b>V<sub>dss</sub> (L)</b>	4,37 ± 0,079	4,83 ± 0,12 **	0,0052
<b>AUC<sub>total</sub> (µg h/L)</b>	13,62 ± 0,311	13,38 ± 0,57	Ns
<b>MRT (h)</b>	75,29 ± 4,09	99,67 ± 9,99 *	0,0166

ns, não houve diferença estatística significativa

\*p < 0,05, diferença estatística significativa

\*\*p < 0,01, diferença estatística significativa

## 6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados desse trabalho foi possível concluir que o carvacrol pode atuar tanto como sustância biologicamente ativa, como também atua como lipídeo líquido nas formulações de CLNs, como observado nas análises da influência do carvacrol na matriz lipídica. Utilizando o método de diluição de microemulsão a quente, foi possível selecionar o lipídeo sólido CA (EHL = 9) e baseado nos parâmetros de diâmetro médio, IPD, potencial zeta e eficiência de encapsulação, selecionar uma formulação de CLNs adequada para administração parenteral. Além disso, foi observada nas análises de DSC e DRX uma diminuição da ordenação cristalina da cera de abelha após a formação dos CLNs.

O perfil de liberação do carvacrol a partir dos CLNs foi ajustado ao modelo de Korsmeyer e Peppas, e Weibull e demonstrou que o mecanismo de liberação é possivelmente do tipo difusão Fickiana. Além disso, o encapsulamento do carvacrol em CLNs proporcionou uma menor citotoxicidade em relação ao carvacrol livre ( $p < 0,05$ ), mantendo a viabilidade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Por fim, o perfil farmacocinético *in vivo* do carvacrol após administração IV em bolus sugere que provavelmente este monoterpene fenólico passa por circulação enterohepática e por isso apresentou um longo tempo de meia-vida de eliminação ( $t^{1/2}$ ) de  $51,07 \pm 2,80$  h e baixo valor de clearance (Cl) de  $0,057 \pm 0,003$  L/h. Também foi possível observar que a  $C_0$ , o  $t^{1/2}$  e tempo de residência médio (MRT) e  $V_{dss}$  do carvacrol encapsulado foram maiores do que o carvacrol livre ( $p < 0,05$ ), o que favorece uma maior distribuição do carvacrol nos tecidos alvo, como fígado e baço. Sendo assim é possível concluir que os CLNs desenvolvidos são um promissor sistema de liberação do carvacrol para o tratamento de leishmanioses.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A perspectiva futura deste trabalho centra-se na avaliação a atividade anti-leishmania do carvacrol encapsulado em CLNs *in vivo* e realização testes de biodistribuição *in vivo*, a fim de determinar a concentração do carvacrol encapsulado nos tecidos-alvo. Além disso, o CLN contendo carvacrol desenvolvido no presente trabalho pode servir como plataforma para modificações em sua superfície que podem ser posteriormente investigados a fim de aumentar a seletividade do carvacrol ao parasita da leishmania.



## REFERÊNCIAS

- ABAMOR, E.S.; ALLAHVERDIYEV, A.M. A nanotechnology based new approach for chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: TIO<sub>2</sub>@AG nanoparticles Nigella sativa oil combinations. **Experimental Parasitology**, 166 p. 150-163, 2016.
- AESCHBACH, R. et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**, 32, p. 31-36, 1994.
- AKBARI, et al. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, 172, p. 86–90, 2017.
- ALLAHVERDIYEV A.M. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International Journal of Nanomedicine**, 6, p. 2705–2714, 2011.
- ALEXANDRIDIS, P.; OLSSON, U.; LINDMAN, B. A Record Nine Different Phases (Four Cubic, Two Hexagonal, and One Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline and Two Micellar Solutions) in a Ternary Isothermal System of an Amphiphilic Block Copolymer and Selective Solvents (Water and Oil). **Langmuir**, 14, p. 2627-2638, 1998.
- ALMEIDA et al. Nanotechnological Strategies for Treatment of Leishmaniasis—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 13, p. 117–133, 2017.
- ARUNASREE, K.M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, 17, p. 581–588, 2010.
- ATTAMA, A.A.; SCHICKE, B.C.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Further characterization of theobroma oil-beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 64(3), p. 294–306, 2006.
- BABOOTA, S. et al. Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement. **Journal of Drug Targeting**, 17(3), p. 249 – 56, 2009.
- BEENA, D.K.; RAWAT, D.S. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 23, p.641-645, 2013.
- BEKHIT, A.A. et al. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 160, p. 229-244, 2018.
- BELDA-GALBIS, C.M. et al. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. **Journal of Food Engineering**, 141, p. 37–43, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1° ed. 5° reimpressão, Brasília-DF: 2014, 120p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2° ed. 3° reimpressão, Brasília-DF: 2013, 120p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, 2017.

- BRUNI et al. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **International Journal of Nanomedicine**, 12, p. 5289–5311, 2017.
- CAMARGOS et al. Terpenes Increase the Lipid Dynamics in the Leishmania Plasma Membrane at Concentrations Similar to Their IC<sub>50</sub> Values. **PLOS ONE**, 9, p. 1-9, 2014.
- CAVALLI, R. et al. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, 148, p. 47–54, 1997.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2013). Leishmaniasis. Biology.
- CHEN, Z. et al. Preparation and characteristics of microencapsulated stearic acid as composite thermal energy storage material in buildings. **Energy and Buildings**, 62, p. 469-474, 2013.
- CHOOLOCK, K. et al. Plasma and dermal pharmacokinetics of terpinen-4-ol in rats following intravenous administration. **Pharmazie**, 68, p. 135–140, 2013.
- CHORILLI, M. et al. Desenvolvimento de sistemas líquido - cristalinos de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, 32, p. 1036-1040, 2009.
- CRAIG, E. et al. Structurally optimized analogs of the retrograde trafficking inhibitor Retro-2cycl limit *Leishmania* infections **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 11, p. 1-18, 2017.
- DANTAS, I.L. et al. Influence of stearic acid and beeswax as solid lipid matrix of lipid nanoparticles containing tacrolimus. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 132, p. 1557–1566, 2018.
- DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, p. 505–521, 2007.
- DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, 17, p. 1471–1477, 2011.
- DE MATOS, S.P.; LUCCA, L.G., KOESTER, L.S. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, 195, p. 204-214, 2019.
- DE SMET J. et al. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: A bio-analytical CLAE method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, 877, p. 961-967, 2009.
- DE SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, 16, p. 2233- 2252, 2011.
- DE SOUZA, A. et al. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, 547, p. 421–431, 2018.
- DOMINGO, C.; SAURINA, J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: towards green and sustainable pharmaceuticals: A review. **Analytica Chimica Acta**, 744, p. 8–22, 2012.

ENOKI, T. A. **Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física, USP, 2010, São Paulo.

FADDA, P. et al. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. **International Journal of Pharmaceutics**, 446, p. 166-175, 2013.

FANGUEIRO, J.F. et al. Biopharmaceutical evaluation of epigallocatechin gallate-loaded cationic lipid nanoparticles (EGCG-LNs): In vivo, in vitro and ex vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, 502, p. 161–169, 2016.

FARIAS-JUNIOR, P.A. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, 45, p. 399-402, 2012.

FERREIRA, Sarah G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on *in situ* gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, 456, p. 190-196, 2015.

FREITAS, C.; LUCKS, J.S.; MÜLLER, R.H. P238 effect on storage conditions on long-term stability of “solid lipid nanoparticles” (SLN) in aqueous dispersion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2, p. 178, 1994.

FREITAS-JUNIOR, L.H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2, p. 11–19, 2012.

GAILLARD, Y. et al. Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. **Thermochimica Acta**. 521, p. 90-97, 2011.

GALVÃO, J.G. et al. Effect of *Ouratea* sp. butter in the crystallinity of solid lipids used in nanostructured lipid carriers (NLCs). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 123(2), p. 941-948, 2016.

GAO, Y. et al. Drug enterohepatic circulation and disposition: constituents of systems pharmacokinetics. **Drug Discovery Today**, 19, p. 326-340, 2014.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.119>, 2016.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. **A nomenclatura em análise térmica – parte II**. *Cerâmica*, São Paulo, vol.34, n.225, p.163-164, 1980.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 26, p. 293-307, 2012.

GUIMARÃES, A.G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, 227, p. 69-76, 2015.

- GUIMARÃES, A.G. et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response, **Naunyn. Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 385, p. 253–263, 2012.
- GAILLARD, Y. et al. Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. **Thermochimica Acta**, 521(1-2), p. 90–97, 2011.
- GUPTA, S. Drug delivery strategies for therapy of visceral leishmaniasis. **Expert Opinion Drug Delivery** 7, p. 371–402, 2010.
- GASCO, M.R. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution**. United States Patent, 1993, USS 188837.
- GUTIÉRREZ et al., New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis **Chem. Soc. Rev.** 45, p. 152–168, 2016.
- HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 315, p. 210–216, 2008.
- HANDLER, M.Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of American Academy of Dermatology**, 73, 6, p. 897–908, 2015.
- HEIDARI-KHARAJI, M. et al. Enhanced paromomycin efficacy by solid lipid nanoparticle formulation against *Leishmania* in mice model. **Parasite Immunology** 38, 599–608, 2016.
- HEJRI, A. et al. Optimisation of the formulation of b-carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. **Food Chemistry**, 141, p. 117–123, 2013.
- HIGUERAS, L. et al. Incorporation of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins into chitosan films to tailor loading capacity for active aroma compound carvacrol. **Food Hydrocolloids**, 43, p. 603–611, 2015.
- HU, F.Q. et al. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, 314, p. 83–89, 2006.
- HU, F.Q. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 45, p. 167–173, 2005.
- HU, F.Q. et al. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, 239, p. 121–128, 2002.
- IGE, P.P.; BARIA, R.K.; GATTANI, S. G. Fabrication of fenofibrate nanocrystals by probe sonication method for enhancement of dissolution rate and oral bioavailability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 108, p. 366–373, 2013.
- JANNIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60, p. 734–746, 2008.

JEBALI A., KAZEMI B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology In Vitro**, 27, p. 1896–1904, 2013.

JUNG et al. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37, p. 313-320, 2009.

KASONGO, K. W. et al. Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of Didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 100, p. 5185–5196, 2011.

KAWASHIMA, Y. et al. Properties of a peptide containing DL-lactide:glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 45, p. 41–48, 1998.

KHERADMANDNIA, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 6, p. 753-759, 2010.

KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, 43(2–3), p. 85-103, 2012.

KUMBHAR, D.D., POKHARKAR, V.B. Engineering of a nanostructured lipid carrier for the poorly water-soluble drug, bicalutamide: Physicochemical investigations. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 416, p. 32-42, 2013.

LACERDA, S.P. **Carreador lipídico nanoestruturado à base de cera de carnaúba: Desenvolvimento e Caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3. Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife, 2009, Universidade Federal de Pernambuco.

LAKSHMI, P.; KUMAR, G. A. Nanosuspension technology: A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2(4), p. 35-40, 2010.

LOPES, R. et al. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 45, p. 442-450, 2012.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 2, p.01 - 37, 2009.

MARGULIS-GOSHEN, K.; MAGDASSI, S. Organic nanoparticles from microemulsions: Formation and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 17, p. 290–296, 2012.

MARTINS, A.J. et al. Beeswax organogels: Influence of gelator concentration and oil type in the gelation process. **Food Research International**, 84, p. 170–179, 2016.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Physicochemical characterization by AFM, FT-IR and DSC and biological assays of a promising antileishmania delivery system loaded with a natural Brazilian product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 123, p. 195-204, 2016.

MEDEIROS, M.G.F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, 60, p. 237-241, 2011.

MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 2010.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, p.83–101, 2012

MELO, J.O. et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, 128, p.110–115, 2013.

MICHIELS, J. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88, p. 2371–2381, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016, 2017a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016, 2017b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2016, 2017c.

MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, 414(1–2), p. 267–275, 2011.

MONTEIRO, L.M. et al. Buparvaquone nanostructured lipid carrier: development of an affordable delivery system for the treatment of leishmaniasis. **Biomedical Research International**, p. 1–11, 2017.

MONZOTE, L. et al. Interaction of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. with mitochondria in *Leishmania* and other eukaryotes. **Phytotherapy Research**, 32, p. 1729–1740, 2018.

MONZOTE, L. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. **Experimental Parasitology**, 136, 20–26, 2014a.

MONZOTE, L. et al. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**, 21, p. 1048–1052, 2014b.

MOREL, S. et al. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 132, p. 259–261, 1996.

MORENO, E. et al. Assessment of  $\beta$ -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 11, p. 2003–2012, 2015.

MUKKAVILLI, R. et al. Absorption, Metabolic Stability, and Pharmacokinetics of Ginger Phytochemicals. *Molecules*, 22, p. 1–13, 2017.

MÜLLER, R.H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, p.522–530, 2007.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 242, p. 121-128, 2002.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50, p.161-177, 2000.

NNAMANI, P.O. et al. Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, 477, p. 208-217, 2014.

NO, J.H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, 155, p. 113-123, 2016.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitology Today**, 9, 323–328, 1993.

OKOUR, M.; BRUNDAGE, R.C. Modeling Enterohepatic Circulation. **Current Pharmacology Reports**, 3, p. 301-313, 2017.

Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington, 2018.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, 309, p. 44–50, 2006.

PAPAGIANNAROS, A. et al. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 59, p. 545–550, 2005.

PARTIDAR, A. et al. A review on novel lipid based nanocarriers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2, p. 30-35, 2010.

PASTOR, J. et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against Leishmania. **Acta Tropica**, 145, p. 31-38, 2015.

PETRI E SILVA, S.C.S. et al. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against Leishmania (Leishmania) infantum promastigotes and intracellular amastigotes. **Experimental Parasitology**, 163, p. 63-75, 2016.

PHAM, T.T.H. et al. Development of antileishmanial lipid nanocomplexes. **Biochimie**, 107, p. 143-153, 2014.

PHAM, T.T.H. et al. Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B–miltefosine-loaded nanocochleates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 106, p. 224-233, 2013.

PHAM, T.T.H.; LOISEAU, P.M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **International Journal of Pharmaceutics**, 454, p. 539-552, 2013.

- PRADOS, J. et al. Application of nanotechnology in the treatment and diagnosis of gastrointestinal cancers: review of recent patents. **Recent Patents on Anticancer Drug Discovery**, 9 (1), p. 21-34, 2014.
- POKHARKAR, V.B. et al. Development and optimization of eugenol loaded nanostructured lipid carriers for periodontal delivery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 3, p. 138-143, 2011.
- POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 22, p. 277-286, 2008.
- QASIM, M. et al. Nanotechnology for diagnosis and treatment of infectious diseases. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 14 (10), p. 7374-7387, 2014.
- RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51, p. 1425-1430, 2007.
- RAMOS, M. et al. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films **LWT - Food Science and Technology**, 58, p. 470-477, 2014.
- RIBEIRO, L.N.M. et al. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 93, p. 192–202, 2016.
- ROBERTS, M.S. et al. Enterohepatic Circulation Physiological, Pharmacokinetic and Clinical Implications. **Clinical Pharmacokinetics**, 41, p. 751-790, 2002.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6th ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and The American Pharmaceutical Association, p. 697-699, 2009.
- SANTOS, E.H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, 60, p. 583-592, 2015.
- SCHWARZ, C. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, **Journal of Controlled Release**, 30, p. 83–96, 1994.
- SCHOELER, N. et al. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, 221, p. 57-67, 2001.
- SCHOELER, N. et al. Effect of solid lipid nanoparticles (SLN) on cytokine production and the viability of murine peritoneal macrophages. **Journal of Microencapsulation**, 17, p. 639–650, 2000.
- SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 125-131, 2003.
- SEVERINO, P. et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery, **Journal of Drug Delivery**, p.1-10, 2012.



SEVERINO, P. et al. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, 86(1), p. 125-130, 2011.

SHAH, A.V; SERAJUDDIN, A.T.M. Development of Solid Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) I: Use of Poloxamer 188 as Both Solidifying and Emulsifying Agent for Lipids. **Pharmaceutical Research**, 29, p. 2817–2832, 2012.

SHAH, K. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Biocompatible microemulsions for fabrication of glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 396-400, 2009.

SHARIFI-RAD, M. et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review, **Phytotherapy Research**, 32, p. 1675-1687, 2018.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. P234 solid lipid nanoparticles stabilized by tyloxapol, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2, p. 177, 1994.

SILVA, F. et al. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal of Medicinal Food**, 15(11), p.984-991, 2012.

SILVA, A.R.S.T. et al. Leishmanicidal Activity and Structure-Activity Relationships of Essential Oil Constituents. **Molecules**, 22, 815, p. 1-10, 2017.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 485-497, 2012.

SOUTO, E.B. et al. Nanopartículas de lipídeos sólidos: Métodos Clássicos de Produção Laboratorial. **Química Nova**, 34, p.1762-1769, 2011.

SOUZA A.L.R. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo Praziquantel**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, 2011.

SUNDAR, S. et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, 362, p. 504–512, 2010.

SUNYOTO, T.; POLET, J. BOELAERT, M. Why miltefosine - a life-saving drug for - leishmaniasis is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, 3, p. 1-10 2018.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 3. ed. New York: Informa Healthcare, 2007, p. 4066.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 19, p. 29-43, 2013.

TAN, S.W. et al. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 372, p. 73-79, 2010.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; CHANTABURANAN, T.; JUNYAPRASERT, V. B. Influence of state and crystallinity of lipid matrix on physicochemical properties and

permeation of capsaicin-loaded lipid nanoparticles for topical delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 39, p. 300-307, 2017.

TIUMAN, T.S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, 15, p. 525-532, 2011.

TSAL, M-J. et al. Baicalein loaded in tocol nanostructured lipid carriers (tocol NLCs) for enhanced stability and brain targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, 423, p. 461– 470, 2012.

TSAO, N.H., HALL, E.A.H. Model for Microcapsule Drug Release with Ultrasound-Activated Enhancement. **Langmuir**, 33, p.12960–12972, 2017.

VAN DE VEN, H. et al. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin  $\beta$ -aescin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, 420, p. 122-132, 2011.

VEERAREDDY P.R.; VOBALABOINA V.; ALI N. Antileishmanial activity, pharmacokinetics and tissue distribution studies of mannose-grafted amphotericin B lipid nanospheres. **Journal of Drug Targeting**, 17(2), p. 140–147, 2009.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J.R.; MÜLLER-GOYMANN CC. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 60(1), p. 113–122, 2005.

VIÑAS, P.; SOLER-ROMERA, M.S.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid chromatographic determination of phenol, thymol and carvacrol in honey using fluorimetric detection. **Talanta**, 69, p. 1063–1067, 2006.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Updated February 2018 (acessado em 11.12.18).

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 91, p. 287–296, 2016.

YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6, p. 170-178, 2010.

YANG, X. et al. Preparation and characterization of 4-dedimethylamino sancycline (CMT-3) loaded nanostructured lipid carrier (CMT-3/NLC) formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, 450, p. 225–234, 2013.

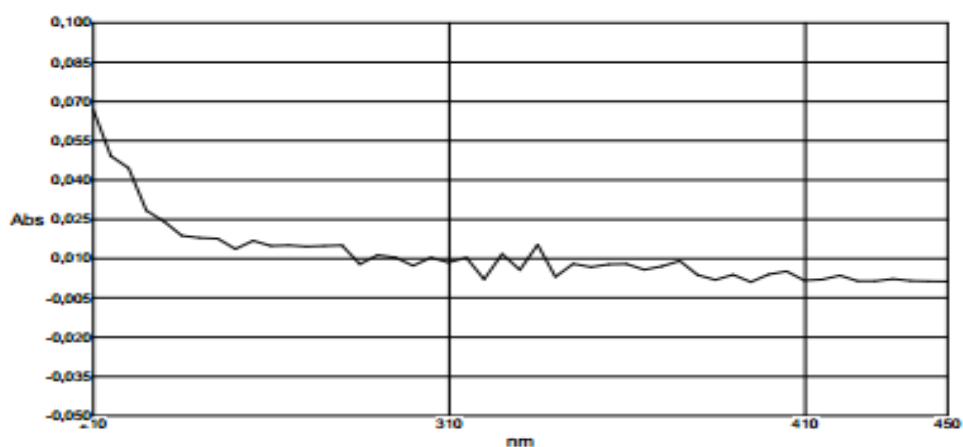
YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D.S., RICHARDSON, D.R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. **Pharmacological Reviews**, 68, p. 701-787, 2016.

ZHANG, J. et al. Lactoferrin- and RGD-comodified, temozolomide and vincristine-coloaded nanostructured lipid carriers for gliomatosis cerebri combination therapy. **International Journal of Nanomedicine**, 13, p. 3039–3051, 2018.

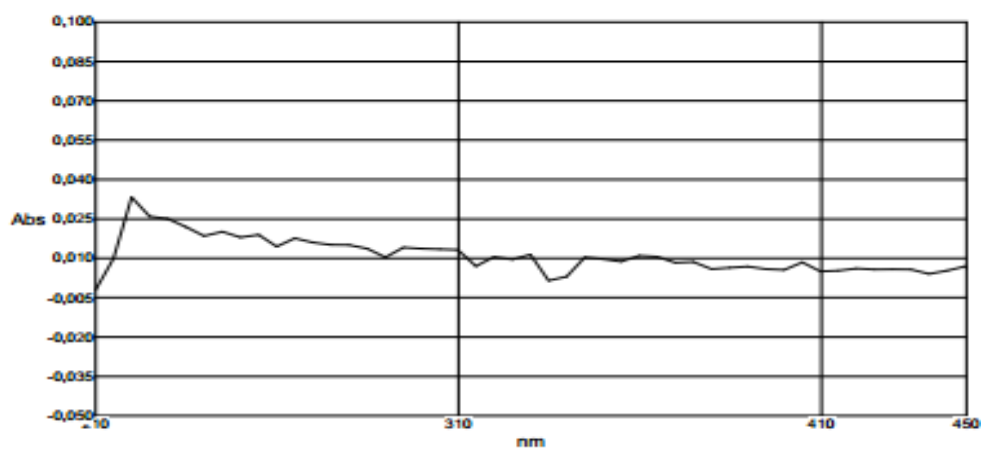
ZHENG, K. et al. The effect of polymer-surfactant emulsifying agent on the formation and stability of  $\alpha$ -lipoic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC), **Food Hydrocolloids**, 32 p. 72–78, 2013.

## APÊNDICE A- VARREDURAS ESPECTROFOTÔMETRICAS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)

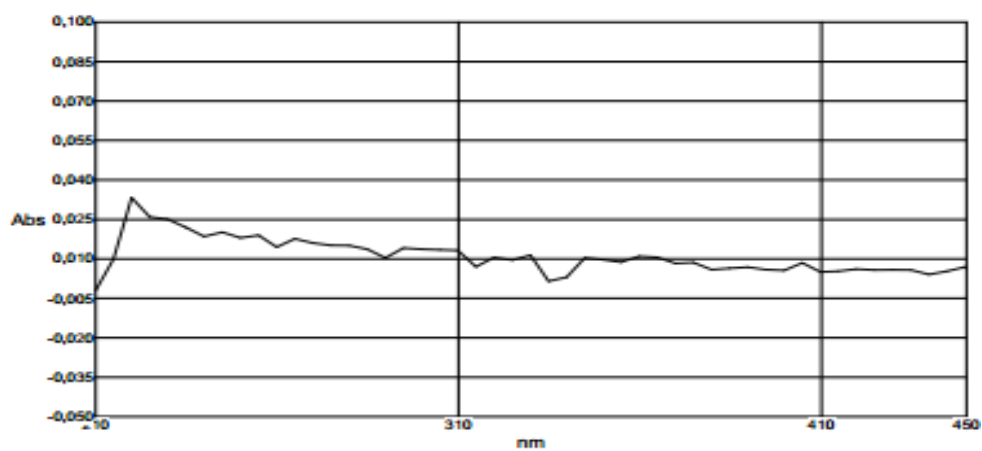
**Figura 1:** Varredura espectrofotométrica ( $\lambda = 210$  a 450 nm) na região do ultravioleta (UV) para o ácido esteárico



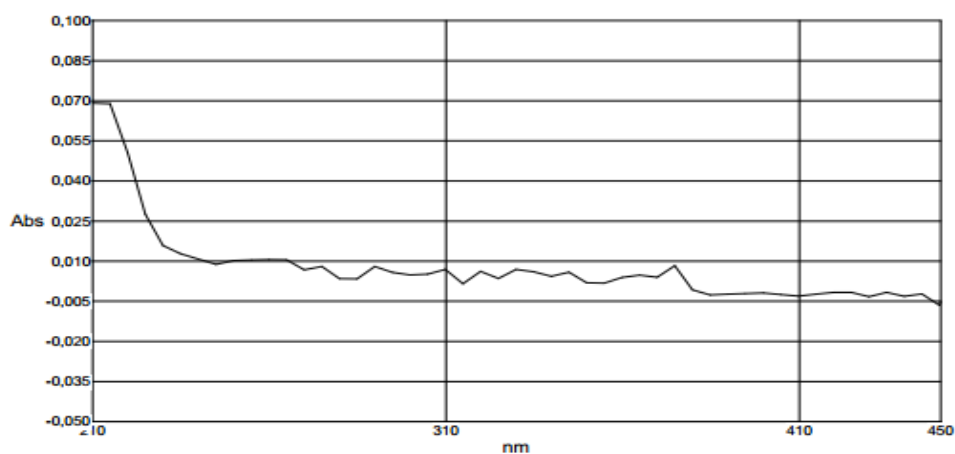
**Figura 2:** Varredura espectrofotométrica ( $\lambda = 210$  a 450 nm) na região do ultravioleta (UV) para a cera de abelha.



**Figura 3:** Varredura espectrofotométrica ( $\lambda = 210$  a 450 nm) na região do ultravioleta (UV) para a cera de carnaúba.



**Figura 4:** Varredura espectrofotométrica ( $\lambda = 210$  a 450 nm) na região do ultravioleta (UV) para o Kolliphor<sup>®</sup> P188.



## APÊNDICE B – RESUMO ACEITO PARA APRESENTAÇÃO EM PÔSTER NA 5TH NANOTODAY CONFERENCE (HAWAII-USA)

### Title:

**Development of nanostructured lipid carriers containing a phenolic monoterpene for cutaneous leishmaniasis**

### Authors & affiliations:

*Juliana G. Galvão<sup>1,3</sup>, Raquel L. Santos<sup>1</sup>, Audrey R.S.T. Silva<sup>2</sup>, Silvio S. Dolabella<sup>2</sup>, Ricardo Scher<sup>2</sup>, Rogéria S. Nunes<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Pharmacy Department, Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil*

<sup>2</sup>*Morphology Department, Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Pharmaceutics, University of Florida, 32611, Gainesville, FL, USA*

### Abstract:

Nanostructured lipid carriers (NLCs) have been investigated to leishmaniasis treatment since they are able to being absorbed by *Leishmania* infected phagocytic cells, improving the therapeutic efficacy and safety of active compounds. Thus, the aim of this study is to develop NLCs containing a phenolic monoterpene for cutaneous leishmaniasis. The NLCs were obtained by the warm microemulsion method and evaluated the influence of the solid lipid used (stearic acid, beeswax and carnauba wax), lipid (2 and 5%) and surfactant (1, 2 and 5%) concentrations and the presence of active compound, in parameters such as particle size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency. The NLCs prepared with beeswax presented the lowest particle size (~150 nm) and polydispersity index (~ 0.2). Changing the solid lipid, however, did not affect the zeta potential  $|\geq 30 \text{ mV}|$ . As expected, lowering the lipid and surfactant concentration will result in lower and higher particle size respectively. In addition, the presence of the active compound slightly increased the particle size. All the formulation tested presented polydispersity index lower than 0.5, which means that the NLCs obtained a narrow particle size distribution, and zeta potential higher than  $|\geq 30 \text{ mV}|$ , thus demonstrating a good colloidal stability. Finally, the best encapsulation efficiency was obtained in the formulation by using 5% of lipids and surfactant. Therefore, this is a promising NLC formulation to perform tests against leishmania parasites.

**APÊNDICE C– ARTICLE SUBMITTED AT INTERNATIONAL JOURNAL OF  
PHARMACEUTICS (IN PRELO): “EFFECT OF CARVACROL ON THE  
CRYSTALLINITY PROFILE OF STEARIC ACID, BEESWAX AND CARNAUBA  
WAX AS MATERIALS FOR PRODUCTION OF NANOSTRUCTURED LIPID  
CARRIERS”**

**Abstract**

Interest in lipid based drug delivery systems has been rising since they are biocompatible, prevent compounds from chemical degradation and allows a controlled drug release through several administration routes. Therefore, it is important to investigate the lipid excipients with respect to the physicochemical characteristics to determine its suitability in pharmaceutical products. This study aimed to assess the influence of carvacrol on the type and structure of lipid matrices used for manufacturing nanostructured lipid carriers. The chosen solid lipids, stearic acid (SA), beeswax (BW) and carnauba wax (CW) were mixed with 10, 25 and 50% of carvacrol, separately, for 5 minutes at 80°C and submitted to a tempering process (heating-cooling or recrystallization). Subsequently, the samples were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), small angle X-ray scattering (SAXS) and polarized light microscopy (PLM). DSC curves showed a shift of the melting point to lower temperatures, and a decrease in enthalpy in the lipid mixtures containing 10, 25 and 50% of carvacrol. Also, DSC indicated that the solid lipids and carvacrol in the tested concentration range are miscible. SAXS and PLM demonstrated that the lipid matrices became less-ordered as the carvacrol content increased. Thus, carvacrol also may be serve as liquid lipid in NLCs, since the lipid matrices became less ordered after its addition. Thus, these lipid matrices can be selected to obtaining NLCs as drug delivery system for pharmaceutical applications.

## Introduction

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) is a phenolic monoterpene found in essential oils obtained from a great number of aromatic plants such as black cumin (*Nigella sativa* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), and thyme (*Thymus vulgaris* L.).<sup>1,2</sup>

Several recent studies have demonstrated that carvacrol has pharmacological and biological activities such as analgesic<sup>3</sup>, anti-inflammatory<sup>4</sup>, antimicrobial<sup>5</sup>, antitumor<sup>6</sup>, antioxidant<sup>7,8</sup>, antiprotozoal action.<sup>9–11</sup>

However, carvacrol presents some disadvantages such as low aqueous solubility, due to its lipophilic nature, easy oxidation, and volatility, which may limit its application.<sup>1</sup> Therefore, the development of new strategies employing nanotechnology is promising to reduce volatility and improve bioavailability.<sup>12</sup> Few studies have been done with carvacrol loading in nanoparticles.<sup>13,14</sup> However, no studies were reported using carvacrol loaded in lipid nanoparticles and it has been reported that lipid mixtures presents a great impact in the chemical stability of volatile substances.<sup>15</sup>

Among lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers (NLCs) can be considered attractive as they consist in nanometric particles obtained from lipid mixtures between solid and semisolid or liquid lipids dispersed in a surfactant solution, maintaining solids at body and room temperature.<sup>16</sup> The major advantages of these systems comprise protection of compounds from chemical degradation, controlled release of substances due to the solid state of the matrix, biocompatibility and low toxicity.<sup>17</sup>

Therefore, NLCs is considered useful for loading lipid and drugs (as carvacrol) improving loading capacity, physical and chemical stability; and may triggering drug release by disrupting the crystal packing structure.<sup>18</sup> Furthermore, NLC crystallization, melting



temperatures and polymorphic content have demonstrated to be strongly dependent on the solid:liquid lipid ratio.<sup>19</sup>

Lipids excipients used for obtaining NLCs consist of fatty acids, fatty alcohols, glycerides (such as polyoxylglycerides, triglycerides, partial glycerides), vegetable oils and waxes.<sup>20</sup> In pharmaceutical products incorporating lipid nanocarriers is desirable the employment of natural lipids.<sup>21</sup> Stearic acid is an endogenous long-chain fatty acid found as a primary component in both animal and vegetal origin which provides higher *in vivo* tolerability with less toxicity than synthesized fats.<sup>22,23</sup> Beeswax is a natural fatty material obtained from combs of bees (*Apis mellifera*), highly crystalline (melting point between 61 and 67°C)<sup>24,25</sup>. Carnauba wax is a plant exudate from the Brazilian “tree of life” (*Copernicia cerifera*) presenting high crystallinity, composed almost entirely of wax acid esters of C24 and C28 carboxylic acids and saturated long-chain mono-functional alcohols.<sup>26</sup> The studied lipids are recognized non-toxic and considered as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA). The employment of these fats in drug delivery systems has also been reported.<sup>27–29</sup>

Few studies have been published exploring the lipid matrices employed for manufacturing NLCs. Since the majority of NLC preparation methods require heating, the volatility of carvacrol might be a concern. Also, its liquid state nature may affect the lipid matrix structure, thus, is extremely important to predict the impact of carvacrol in the lipid matrix before NLC preparation. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of carvacrol and its concentration in matrices used for production of NLCs systems by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), Small angle X-ray Scattering (SAXS) and polarized light microscopy (PLM).

## Material and Methods

### *Material*

Stearic acid was acquired from Dinâmica<sup>®</sup> (Diadema, SP, Brazil), beeswax and carnauba waxes were purchased from GM Ceras (São Paulo, SP, Brazil). The monoterpene carvacrol was provided by Sigma Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA).

### *Sample Preparation*

The solid lipids, stearic acid (SA), beeswax (BW) and carnauba wax (CW) were heated, above their melting points 58°C, 63°C and 82°C, respectively. Thereafter, they were cooled to room temperature (recrystallization process).<sup>30</sup> To prepare the binary mixtures, the solid lipids (SA, BW, CW) and carvacrol were heated and melted at a temperature of 85°C, then mechanically mixed for 5 minutes, subsequent cooled down, and mixed until solidification. The binary mixtures were prepared containing 10(SA10%, BW10%, CW10%), 25(SA25%, BW25%, CW25%) and 50% (SA50%, BW50%, CW50%) of carvacrol. After these procedures, the samples were characterized.

### *Thermogravimetry (TG)*

TG analysis was performed using Q50 TG equipment (TA Instruments, New Castle, DE, USA). TG curves were acquired in the range 25 to 600°C, under heating rate of 10°C min<sup>-1</sup> and under dynamic argon atmosphere (50 mL min<sup>-1</sup>) using approximately 10 mg of the sample in platinum crucibles.

### *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

DSC curves were obtained using DSC Q20 equipment (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The analysis were performed in the range of 25 to 100°C, under heating rate of 10°C min<sup>-1</sup> and dynamic argon atmosphere (50 mL min<sup>-1</sup>) using approximately 3 mg of the sample in aluminum crucibles.

### *Small angle X-ray Scattering (SAXS)*

SAXS measurements were carried out on the D1B-SAXS1 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil). The X-ray beam was monochromatized (wavelength = 1.499 Å) by using a silicon-W/B4C toroidal multilayer mirror, collimated by a set of slits defining a pinhole geometry, and detected on a Pilatus 300 k detector (Dectris Ltd., Baden-Dättwil, Switzerland). The sample-to-detector distance was 814 mm, covering a scattering vector “q” ( $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ ) ranging from 0.1 to 4.0 nm, where  $2\theta$  = scattering angle. Measurements were performed at room temperature, a standard silver behenate powder was measured to calibrate the sample-to-detector distance, detector tilt, and direct beam position (room temperature). From the total scattering intensity, the parasitic scattering produced was subtracted.<sup>31</sup>

### *Polarized light microscopy (PLM)*

The samples, SA, BW, CW, and their mixtures with carvacrol (10, 25 and 50%), were examined under a polarizing light with an Olympus model BX-51 microscope (Tokyo, Japan), coupled to a digital camera LC Color Evolution (PL-A662). The images were digitized using the program PixeLINK (Gloucester, ON, Canada). The samples were heated above melting point and deposited between two glass plates. Then, they were observed in the Polarized light microscope at room temperature (25°C). All samples were observed using 20X magnification.

## RESULTS AND DISCUSSION

The evaluation of lipid matrices is a crucial step in the development of NLC formulations, since is required that matrix remains in solid state at room temperature. Furthermore, it is possible to predict modifications during the recrystallization process in NLCs preparation, and the miscibility between the solid lipids with the liquid lipid.<sup>21,32</sup>

In general, NLCs preparation methods require heating, the volatility of carvacrol might be a concern. Therefore, TG analysis can be useful to determine the mass change after the tempering process. Figure 1 present the mass change (%) in function of temperature regarding solid lipids such as SA, BW and CW (respectively) and its binary mixtures containing 10, 25 and 50% of carvacrol.

### (FIGURE 1)

In Figure 1, the TG curve of the SA is shown, two losses in mass were identified, the first one in the temperature range of 161 – 306°C ( $\Delta m_1 = 79.63\%$   $T_{peak} \text{ DTG} \sim 267^\circ\text{C}$ ) characteristic of SA decomposition, and the second one in the range of 306 - 410°C related to elimination of carbonaceous material.<sup>34,35</sup> It is also possible to observe the TG curve of the beeswax, which presented only one loss in mass in the temperature range of 180 – 480°C ( $\Delta m_1 = 99.5\%$   $T_{peak} \text{ DTG} \sim 396.7^\circ\text{C}$ ), and the carnauba wax also presented only one loss in mass in the temperature range of 250 – 500°C ( $\Delta m_1 = 98.5\%$   $T_{peak} \text{ DTG} \sim 426.1^\circ\text{C}$ ).

Binary mixtures of SA, BW and CW containing 10, 25 and 50% of carvacrol also were evaluated by TG. It was possible to observe that even after heating for 5 minutes in the sample preparation; carvacrol was detected on first loss in mass of the TG curves almost with the same percentage that those used to prepare the samples (10, 25 and 50%) (Table 1).

### (TABLE 1)

Even though carvacrol is considered a “volatile” monoterpene<sup>36</sup>, it is possible to observe in Figure 1 that adding carvacrol to solid lipids in the three studied proportions was not possible to detect any mass change (%) up to 100°C and, therefore it can be used to obtain nanostructured lipid carriers since the main preparation methods did not requires temperatures above 100°C.<sup>17</sup>

DSC is an important tool to characterize NLCs formulations and its components, providing information related to physical state, crystallinity and the energy associated with fusion of the lipid matrix through thermal behavior.<sup>33</sup> Figure 2 present DSC curves for solid lipids SA, BW and CW and its binary mixtures containing 10, 25 and 50% of carvacrol.

### (FIGURE 2)

In the Figure 2 it is possible to observe that SA presents an endothermic event in the temperature range of 40 to 65°C ( $T_{\text{peak}} \sim 57^{\circ}\text{C}$ ), which is related to its melting point.<sup>34,35</sup> In addition, Figures 2 and 3 show the endothermic event regarding melting point of the others solid lipids studied, beeswax ( $T_{\text{peak}} \sim 63^{\circ}\text{C}$ ) and carnauba wax ( $T_{\text{peak}} \sim 82^{\circ}\text{C}$ ), respectively. In our previous study<sup>30</sup>, the same solid lipids (bulk) did not demonstrate any changes in melting point, thermal degradation, XRD profile after recrystallization (tempering) process.

Also in Figure 2, it was observed that after adding 10, 25 and 50% of carvacrol, the melting point slightly shifted to lower temperatures (56.34; 54.9; 50.2°C, respectively) compared to bulk stearic acid. Likewise, BW and CW presented shifts in the melting points to lower temperatures after adding 25 and 50% of carvacrol (BW: 61.4, 58.5 and 50.9°C; CW: 81.36, 77.3 and 72.9°C, respectively).

Other important parameter to be considered in DSC analysis is the enthalpy, which is the quantity of heat involved in thermal events. Figure 3, it is demonstrates that upon the

increasing of carvacrol content (10, 25 and 50%), the endothermic events related to melting decreased and consequently enthalpy involved as well, when compared to pure solid lipids. Severino and co-workers (2011)<sup>23</sup> reported in their study regarding stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices that the increase of melting enthalpy and crystallization is inversely proportional to the amount of liquid lipid mixture. After adding triglycerides to stearic acid they observed a decrease of melting enthalpy and crystallinity, which indicated a greater disorder of the lipid crystal. Similar results were found in our study after adding carvacrol (10, 25 and 50%) to the solid lipids (SA, BW and CW) promoting a lipid matrix disorder.<sup>21</sup> A less ordered matrix favors the increasing number of voids in its structure. It is likely that the presence of carvacrol is preventing the complete crystalline rearrangement of the solid lipids.

### (FIGURE 3)

In addition, the miscibility between the studied solid lipids and carvacrol was evaluated through DSC analysis. The depression in the melting point of solid lipids was detected following incorporation of carvacrol in the structure of the solid lipids. The decrease in the  $T_{\text{peak}}$ , onset, enthalpy and increase in the width of the melting event (WME) of SA, BW and CW when 10, 25 and 50% of carvacrol is added to the solid lipids demonstrates that the two components are miscible in this concentration range (Table 2). Similar results were found by Kasongo and co-workers (2011)<sup>32</sup> when Transcutol<sup>®</sup> HP up to 20% (w/w) was added to the solid lipid Precirol<sup>®</sup> ATO 5.

### (TABLE 2)

SAXS curves related to each solid lipid and its mixtures containing 10, 25 and 50% of carvacrol are shown in Figure 4 providing information about structure ordering.

### (FIGURE 4)

Pure SA presented five peaks at  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ) of 1.27, 1.53, 2.25, 3.06, 3.84, characteristic of high ordered materials (Figure 4). The waxes presented peaks with periodicity typical of lamellar structure (1:2:3:4...).<sup>37</sup> Attama and co-workers (2006)<sup>21</sup> also reported a lamellar crystal arrangement for beeswax. By increasing content of carvacrol, some peaks disappeared and/or had some of the solid lipid characteristic peaks intensity lowered, suggesting that carvacrol decreased the structure ordering of the solid lipids, confirming the DSC results.<sup>30</sup>

In Figure 5, the lattice spacing “ $d$ ” in function of carvacrol content is shown.<sup>38</sup> This parameter was calculated by equation 1:

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (1)$$

When increasing carvacrol content the SA did not present any changes in lattice spacing ( $d \sim 4$  nm). For both waxes, the “ $d$ ” value increased in function of carvacrol content. According to Alexandridis and co-workers (1998)<sup>38</sup> as the “ $d$ ” value increases, the amount of interface (and lamellae) decreases and thus the spacing between the lamellae increases. This indicates that carvacrol is probably between the solid lipid lamellae increasing “ $d$ ” value and thus promoting a less ordered structure, confirming the DSC results.

### (FIGURE 5)

Polarized light microscopy (PLM) is a technique used to evaluate the optical behavior of materials. According to the effect that the material causes under polarized light, it will be classified as anisotropic or isotropic.<sup>39</sup> In the characterization of solid lipids, PLM is an interesting tool to observe microstructural changes.<sup>21</sup>

Figure 6 present SA, BW and CW and its binary mixtures containing carvacrol (10, 25 and 50%). It is possible to observe that pure solid lipids exhibited highly ordered crystalline microstructures, as well as observed in the previous characterizations. SA presented needle-

shaped structure, and BW and CW clearly presented maltese cross-characteristic of lamellar structure confirming the data obtained by SAXS.<sup>30</sup>

### **(FIGURE 6)**

By adding 10, 25 and 50% of carvacrol, it is observed that these microstructures decreased in size and thickness compared with pure solid lipids (SA, BW and CW) suggesting a lower crystallinity as it was observed at the previous characterizations (DSC and SAXS). These results are in agreement with Gaillard and co-workers (2011)<sup>25</sup> in which the optical micrographs demonstrated that crystallinity degree of beeswax decreased with increasing content of rosin.

### **Conclusions**

Based on the results in this work, it was possible to conclude that carvacrol may be used as a biological active substance, as well as liquid lipid, in NLCs, since the lipid matrices became less ordered after adding carvacrol. It is hypothesized that lipid mixtures containing 10, 25 and 50% w/w of carvacrol in the solid lipids (SA, BW, and CW) can be selected to obtaining NLCs. DSC analysis showed that lipid mixtures containing 10, 25 and 50% of carvacrol presented lower melting temperatures and enthalpy when compared with the bulk lipid. Also, DSC demonstrated that the solid lipids and carvacrol in the tested concentration range, are miscible. SAXS and PLM analysis indicated a less ordered structure of the binary mixtures in relation to the bulk solid lipid, confirming DSC results. Thus, these mixtures can be further explored in the production of NLCs for oral, topical and systemic applications.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível



Superior (CAPES/Brazil) for supporting funds. We are grateful to the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) Campinas/SP for technical support in the SAXS measurements.

## REFERENCES

1. Santos EH, Kamimura JA, Hill LE, Gomes CL. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;60(1):583-592. doi:10.1016/j.lwt.2014.08.046.
2. Silva F V., Guimarães AG, Silva ERS, et al. Anti-Inflammatory and Anti-Ulcer Activities of Carvacrol, a Monoterpene Present in the Essential Oil of Oregano. *J Med Food*. 2012;15(11):984-991. doi:10.1089/jmf.2012.0102.
3. de Sousa DP. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*. 2011;16(3):2233-2252. doi:10.3390/molecules16032233.
4. Guimarães AG, Xavier MA, de Santana MT, et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012;385(3):253-263. doi:10.1007/s00210-011-0715-x.
5. Belda-Galbis CM, Leufvén A, Martínez A, Rodrigo D. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. *J Food Eng*. 2014;141:37-43. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.05.013.
6. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50(1):161-177. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840199>.
7. Beena, Kumar D, Rawat DS. *Synthesis and Antioxidant Activity of Thymol and Carvacrol Based Schiff Bases*. Vol 23.; 2013. doi:10.1016/j.bmcl.2012.12.001.
8. Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*. 1994;32(1):31-36. doi:10.1016/0278-6915(84)90033-4.
9. Santos IG de A, Scher R, Rott MB, et al. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitol Res*. 2016;115(2):535-540. doi:10.1007/s00436-015-4769-4.
10. de Melo JO, Bitencourt TA, Fachin AL, et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta Trop*. 2013;128(1):110-115. doi:10.1016/j.actatropica.2013.06.024.
11. Pastor J, García M, Steinbauer S, et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. *Acta Trop*. 2015;145:31-38. doi:10.1016/j.actatropica.2015.02.002.

12. Bilia A, Piazzini V, Guccione C, et al. Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. *Planta Med.* 2017;83(5):366-381. doi:10.1055/s-0043-102949.
13. Amato DN, Amato D V., Mavrodi O V., et al. Destruction of Opportunistic Pathogens via Polymer Nanoparticle-Mediated Release of Plant-Based Antimicrobial Payloads. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(9):1094-1103. doi:10.1002/adhm.201500974.
14. Keawchaoon L, Yoksan R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;84(1):163-171. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.12.031.
15. Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Müller RH. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm.* 2011;414(1):267-275. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.008.
16. Patidar A, Thakur DS, Kumar P, Verma J. A review on novel lipid based nanocarriers. 2010;2(4):30-35.
17. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:83-101. doi:10.1016/j.addr.2012.09.021.
18. Zheng M, Falkeborg M, Zheng Y, Yang T, Xu X. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2013;430:76-84. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.03.070.
19. Yang Y, Corona A, Schubert B, Reeder R, Henson M a. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *J Colloid Interface Sci.* 2014;418:261-272. doi:10.1016/j.jcis.2013.12.024.
20. Rosiaux Y, Jannin V, Hughes S, Marchaud D. Solid lipid excipients — Matrix agents for sustained drug delivery. *J Control Release.* 2014;188:18-30. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.004.
21. Attama a a, Schicke BC, Müller-Goymann CC. Further characterization of theobroma oil-beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;64(3):294-306. doi:10.1016/j.ejpb.2006.06.010.
22. Fundarò A, Cavalli R, Bargoni A, Vighetto D, Zara GP, Gasco MR. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol Res.* 2000;42(4):337-343. doi:10.1006/phrs.2000.0695.
23. Severino P, Pinho SC, Souto EB, Santana MHA. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;86(1):125-130. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.03.029.

24. Attama AA, Müller-Goymann CC. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2008;315(1-3):189-195. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.07.035.
25. Gaillard Y, Mija A, Burr A, Darque-Ceretti E, Felder E, Sbirrazzuoli N. Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. *Thermochim Acta.* 2011;521(1-2):90-97. doi:10.1016/j.tca.2011.04.010.
26. Talens P, Krochta JM. Plasticizing Effects of Beeswax and Carnauba Wax on Tensile and Water Vapor Permeability Properties of Whey Protein Films. *J Food Sci.* 2006;70(3):E239-E243. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07141.x.
27. Madureira AR, Campos DA, Fonte P, et al. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. *RSC Adv.* 2015;5(29):22665-22673. doi:10.1039/C4RA15802D.
28. Cho C-W, So J-W, Shin S-C, Cho C-W. Solid lipid nanoparticles of paclitaxel strengthened by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as an oral delivery system. *Int J Mol Med.* 2012;30(4):953-959. doi:10.3892/ijmm.2012.1086.
29. Kheradmandnia S, Vasheghani-Farahani E, Nosrati M, Atyabi F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine.* 2010;6(6):753-759. doi:10.1016/j.nano.2010.06.003.
30. Galvão JG, Trindade GGG, Santos AJ, et al. Effect of Ouratea sp. butter in the crystallinity of solid lipids used in nanostructured lipid carriers (NLCs). *J Therm Anal Calorim.* 2016;123(2):941-948. doi:10.1007/s10973-015-4890-8.
31. Ferreira SG, Conceição VS, Gouveia NS, et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. *J Colloid Interface Sci.* 2015;456:190-196. doi:10.1016/j.jcis.2015.06.012.
32. KASONGO, K. W.; PARDEIKE, J.; MÜLLER, R. H.; WALKER RB. Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of Didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *J Pharm Sci.* 2011;100:5185–5196.
33. Souza ALR de [UNESP]. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel. *Aleph.* 2011;92 f. : il.
34. Chen Z, Cao L, Shan F, Fang G. Preparation and characteristics of microencapsulated stearic acid as composite thermal energy storage material in buildings. *Energy Build.* 2013;62:469-474. doi:10.1016/j.enbuild.2013.03.025.
35. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, American Pharmacists Association. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. London ;;Chicago: APhA/Pharmaceutical Press;

2009.

36. Higuera L, López-Carballo G, Gavara R, Hernández-Muñoz P. Incorporation of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins into chitosan films to tailor loading capacity for active aroma compound carvacrol. *Food Hydrocoll.* 2015;43:603-611. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.07.017.
37. Martins AJ, Cerqueira MA, Fasolin LH, Cunha RL, Vicente AA. Beeswax organogels: Influence of gelator concentration and oil type in the gelation process. *Food Res Int.* 2016;84:170-179. doi:10.1016/j.foodres.2016.03.035.
38. Alexandridis P, Olsson U, Lindman B. A Record Nine Different Phases (Four Cubic, Two Hexagonal, and One Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline and Two Micellar Solutions) in a Ternary Isothermal System of an Amphiphilic Block Copolymer and Selective Solvents (Water and Oil). *Langmuir.* 1998;14(10):2627-2638. doi:10.1021/la971117c.
39. Chorilli M, Campos GR, Bolfarini PML. Desenvolvimento e Estudo da Estabilidade Físico-Química de Emulsões Múltiplas A / O / A E O / A / O Acrescidas de Filtros Químicos e Manteiga de Karité. 2009;28(6):936-940.

## TABLES

**Table 1:** TG data related to the first loss in mass of the solid lipids (SA, BW and CW) containing 10, 25 and 50% of carvacrol.

Samples	1° loss in mass $\Delta m$ (%)
SA 10%	10.40 %
SA 25%	24.44 %
SA 50%	49.48 %
BW 10%	9.66%
BW 25%	23.74%
BW 50%	47.84%
CW 10%	7.82 %
CW 25%	24.20 %
CW 50%	48.07 %

**Table 2:** DSC parameters related for binary mixtures of carvacrol and solid lipids (SA, BW and CW).

Samples	Onset (°C)	MP (°C)	WME <sup>1</sup> (°C)
SA	37.0	57.0	28.0
SA 10%	36.0	56.5	29.0
SA 25%	34.3	54.9	30.0
SA 50%	34.0	50.2	30.0
BW	55.8	63.0	32.6
BW 10%	50.0	61.4	32.7
BW 25%	48.1	58.5	32.7
BW 50%	48.0	50.9	24.5
CW	39.5	82.0	35.5
CW 10%	38.6	81.4	36.5
CW 25%	38.2	77.3	37.1
CW 50%	36.2	72.9	39.2

<sup>1</sup> Width of the melting point

## FIGURE CAPTIONS

**Fig. 1** TG Curves of the stearic acid (A), beeswax (B), carnauba wax (C) and its binary mixtures containing 10%, 25% and 50% of carvacrol.

**Fig. 2** DSC Curves of the stearic acid (A), beeswax (B), carnauba wax (C) and its binary mixtures containing 10%, 25% and 50% of carvacrol.

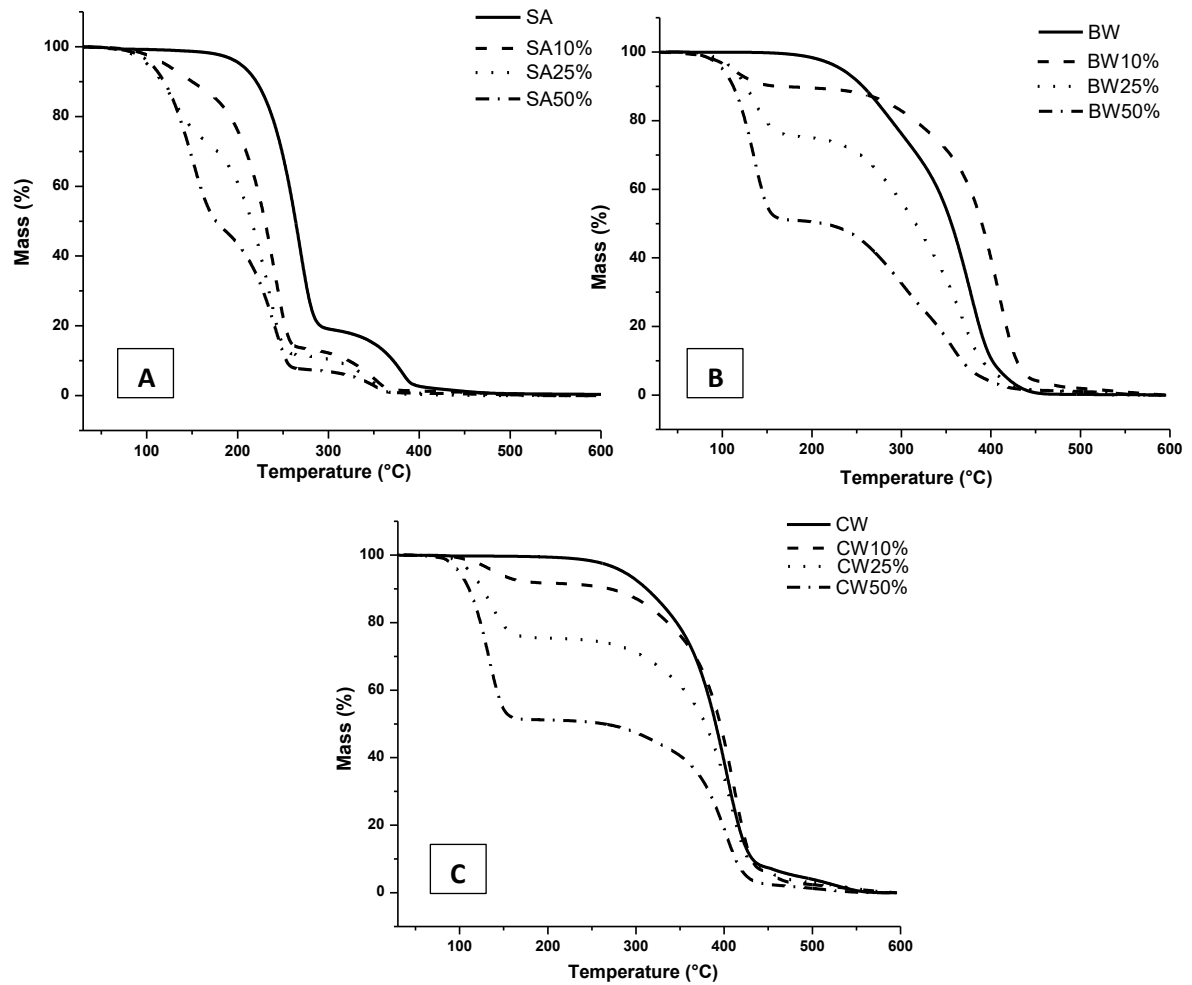
**Fig. 3** Enthalpy in function of carvacrol content regarding each solid lipid studied.

**Fig. 4** Scattering intensity patterns  $I(q)$  in function of scattering vector ( $q$ ) for stearic acid (A), beeswax (B), carnauba wax (C) and its binary mixtures containing 10%, 25% and 50% of carvacrol.

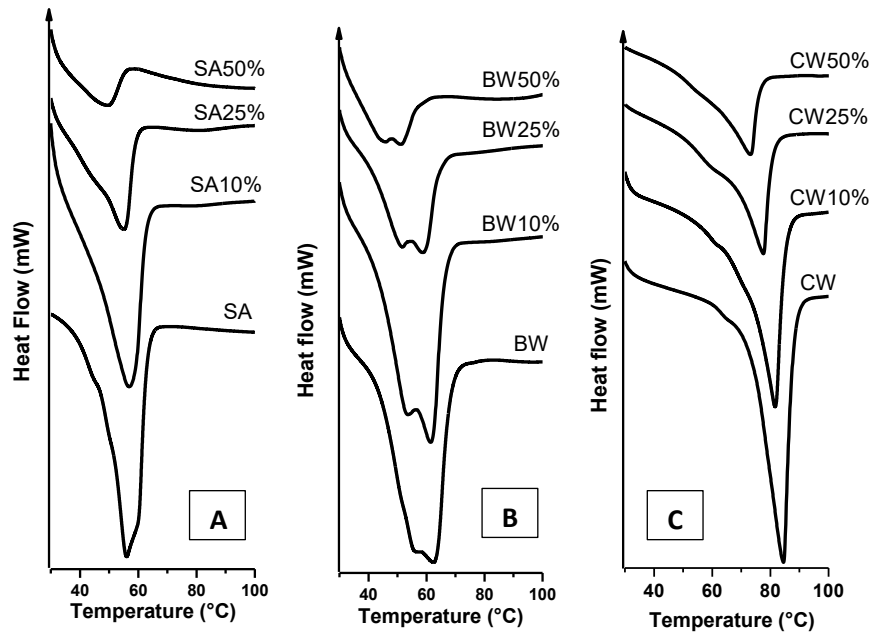
**Fig. 5** Characteristic structural parameter (lattice spacing,  $d$ ) of the solid lipids (SA, BW e CW) plotted as a function of carvacrol content (10, 25% and 50%).

**Fig. 6** Optical micrograph performed in PLM at room temperature corresponding stearic acid, beeswax, carnauba wax and its binary mixtures containing 10%, 25% and 50% of carvacrol. Images obtained using 10X magnification.

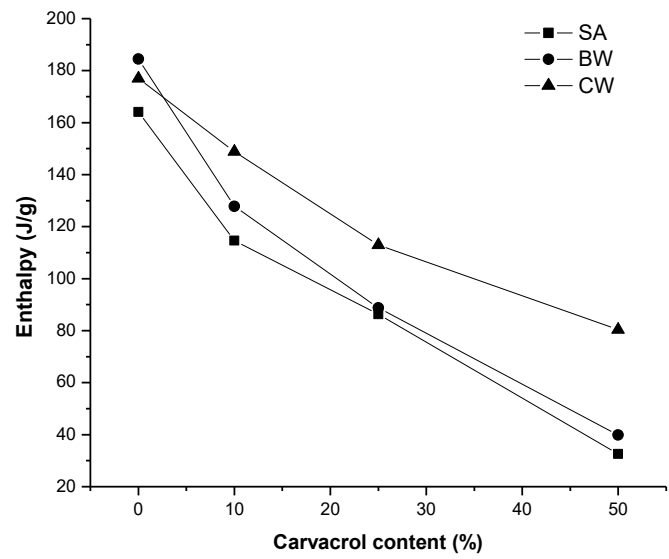
## FIGURES



(FIGURE 1)

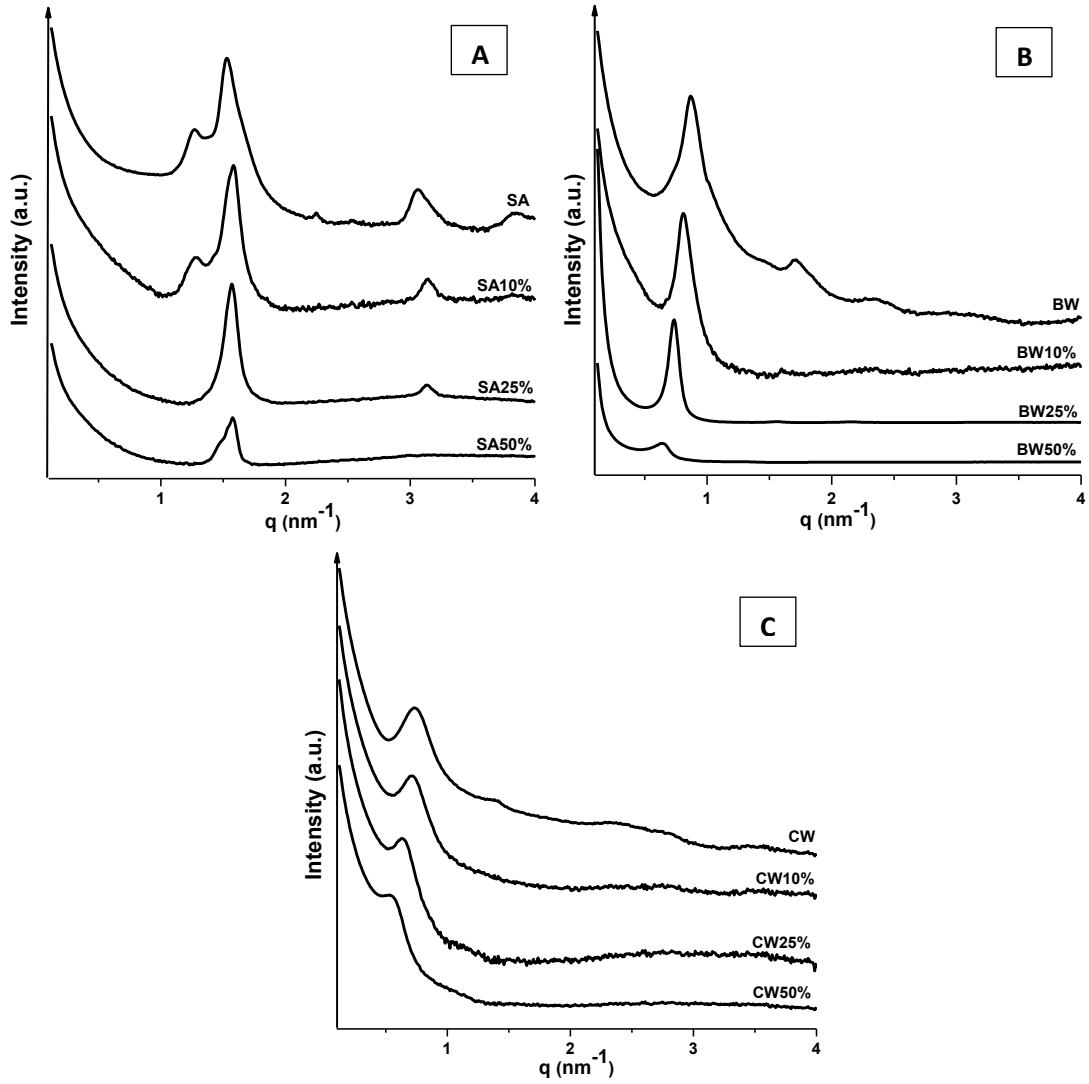


(FIGURE 2)

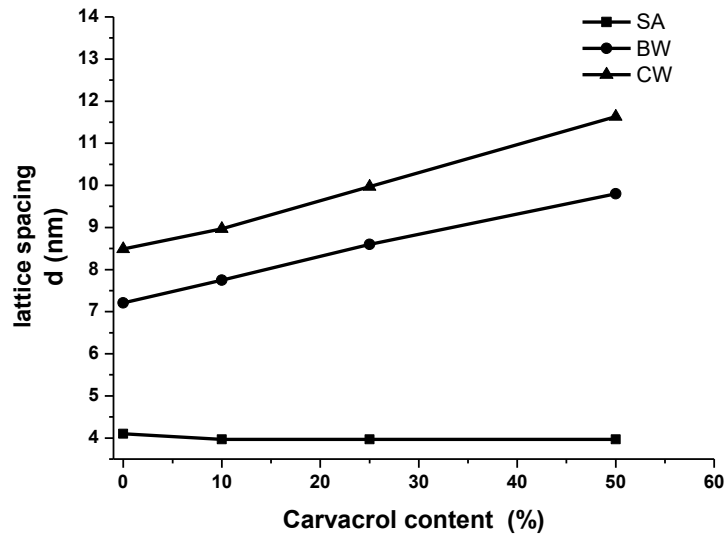


(FIGURE 3)

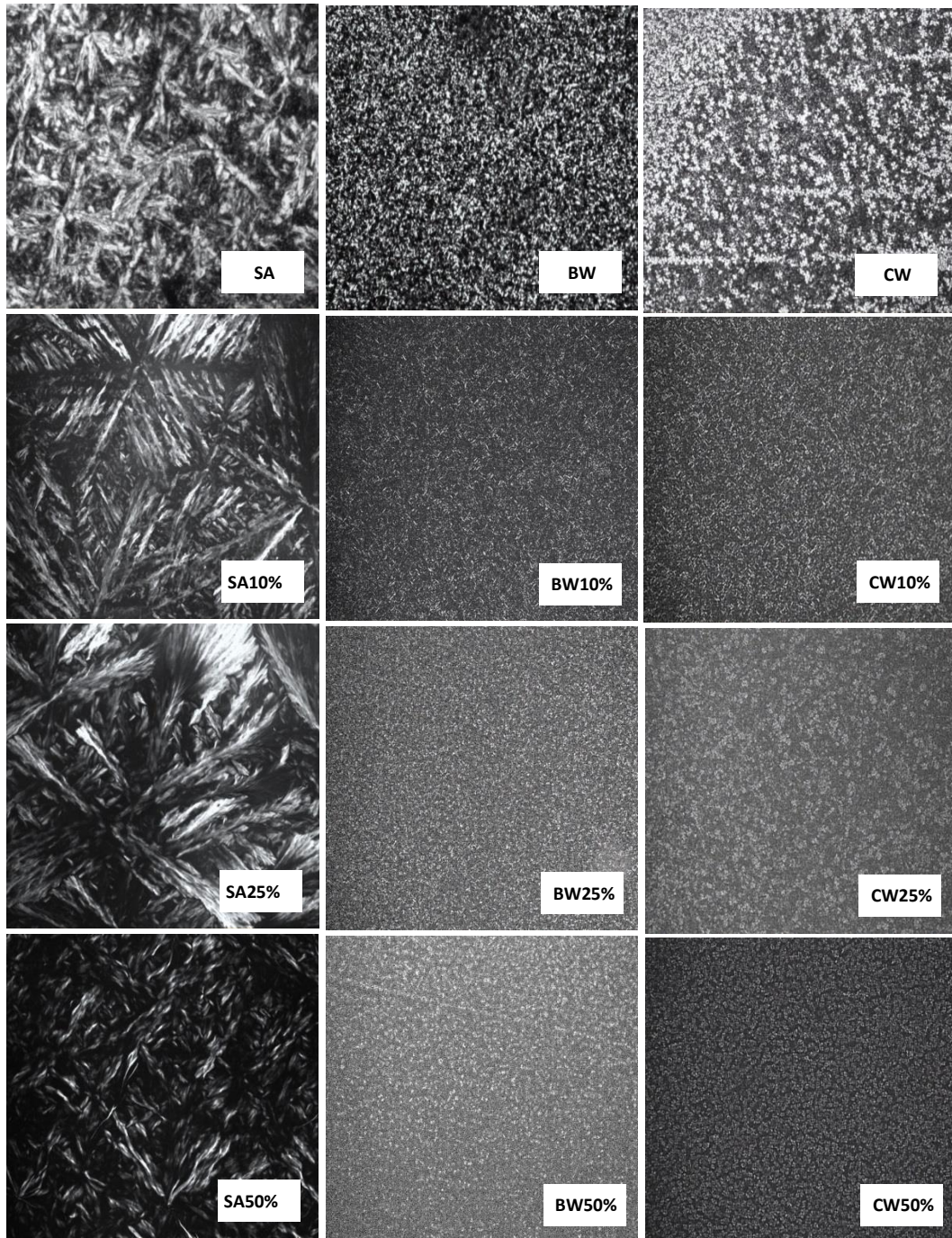




(FIGURE 4)



(FIGURE 5)



(FIGURE 6)